

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SUR L'IMMUNE-ADHÉRENCE DU STAPHYLOCOQUE

MISE EN ÉVIDENCE D'UN SYSTÈME ANTIGÈNE-ANTICORPS SPÉCIFIQUE

R. KOURILSKY, J. PILLET et R. PIÉRON (*).

*(Centre d'Immunopathologie de l'Association Claude Bernard,
Service du professeur agrégé KOURILSKY,
Hôpital Saint-Antoine, Paris)*

Dans un précédent travail [1] (1) le rôle possible des agglutinogènes et des agglutinines staphylococciques dans le phénomène de l'immune-adhérence du staphylocoque avait été souligné. Il avait été, en effet, établi que l'absorption des agglutinines faisait disparaître le phénomène. Il est indispensable d'insister ici sur le fait que cette absorption était réalisée au moyen de corps bactériens totaux desséchés. Le rôle exact des agglutinogènes et des agglutinines dans l'immune-adhérence du staphylocoque était ensuite discuté. La question se posait de savoir si ce système antigène-anticorps était responsable à la fois des deux phénomènes d'agglutination et d'immune-adhérence ou si, au contraire, ces deux phénomènes étaient sous la dépendance de deux systèmes antigène-anticorps différents ; l'absorption des agglutinines par les antigènes bactériens totaux pouvait en effet faire

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 octobre 1955.

(1) *Erratum* : A la page 274 de ce travail, il faut lire à l'alinéa a) *Importance des agglutinines*, que les tests d'adhérence n'étaient nettement positifs, que si les sérums étaient faiblement dilués.

disparaître, en même temps que les agglutinines, un autre anticorps spécifiquement responsable de l'immune-adhérence.

Pour résoudre ce problème, deux séries d'expériences ont été réalisées.

I. — EFFETS COMPARÉS DE LA PAPAÏNISATION DES STAPHYLOCOQUES SUR L'IMMUNE-ADHÉRENCE ET SUR L'AGGLUTINATION.

Nous avons tout d'abord soumis 14 souches de staphylocoques pathogènes à l'action de la papaïne.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE. — Nous avons utilisé l'enzyme protéolytique couramment employé pour la recherche des hémagglutinines irrégulières. La technique que nous avons employée est la suivante :

On effectue dans 3 ml d'eau physiologique une émulsion d'une culture bactérienne de vingt-quatre heures sur gélose. 1 ml de cette émulsion est lavé trois fois en eau physiologique. Après avoir remis le culot bactérien ainsi lavé, en suspension dans l'eau physiologique au volume de 1 ml, on fait une nouvelle suspension à 30 p. 100 en eau physiologique. On dilue alors la poudre d'enzyme contenue dans l'ampoule fournie par l'Institut Pasteur, dans 1 ml d'eau physiologique. On ajoute cette solution protéolytique à 0,5 ml de la suspension précédente de staphylocoques à 30 p. 100. Ce mélange est laissé en contact au bain-marie à 37° pendant une heure. On lave à nouveau trois fois. Le dernier culot bactérien ainsi papaïnisé est mis en suspension finale en eau physiologique au volume de 1 ml.

Avec ces 14 souches nous avons étudié comparativement — pour les bactéries papaïnisées et pour les bactéries témoins non papaïnisées — le test d'immune-adhérence et le taux d'agglutination. Les résultats sont rapportés dans le tableau I.

Trois sujets ont fourni le sérum (dilué au 1/10) et les hématies utilisées dans ces expériences.

Une des souches (Ch...), qui avant papaïnisation ne donnait pas d'agglutination et, après papaïnisation, donnait des agglutinats spontanés, est à excluir de cette étude ; on peut toutefois noter que l'immune-adhérence n'était nullement modifiée pour cette souche. La souche RN a été testée avec deux sérums (March..., Ver...).

Les résultats obtenus avec les 13 autres souches montrent que la papaïnisation ne modifie pas ou pratiquement pas l'immune-adhérence (I. A.), alors qu'elle supprime totalement l'agglutination. Cette dernière notion confirme le travail de l'un de nous [2] qui a montré que la papaïne supprime le pouvoir absorbant du staphylocoque vis-à-vis des agglutinines.

TABLEAU I.

Souches ++	Sérum I/10	Papaine I.P.				Papaine Prolabo	
		Agglutination		I.A.		Agglutination	I.A.
		Avant	Après	Avant	Après		
R N ...	March.	160	0	+++	+++		
Ch...	"	0	Agglutin. spontanés	++	++		
Bo...	"	320	0	++	++		
Wo...	"	160	0	+++	+++		
Gui...	Bec.	320	0	++	++		
Iej...	"	40	0	+++	++		
Roq...	"	160	0	+++	+++		
Mart...	"	320	0	++	++		
Rou...	"	40	0	+++	+++		
Bid...	"	20	0	+++	+++		
I...	Ver.	640	0	+++	+++	Agglutinat. spontanés	++
RN ...	"	1280	0	+++	+++	"	++
Fou...	"	80	0	++	++	"	+
Dig...	"	160	0	++++	++	"	++
Azz...	"	160	0	+++	++	"	++

TABLEAU II

Sérum Ver...				Sérum Mez...				Sérum Poh...			
Agglutinat ⁿ	Avant	Après		Agglutinat ⁿ	Avant	Après		Agglutinat ⁿ	Avant	Après	
RN	1280	1280			320	320			320	320	
Souche I	320	160			320	320			320	320	
Immune-adh.	Avant	Après		Immune-adh.	Avant	Après		Immune-adh.	Avant	Après	
	RN I	RN I			RN I	RN I			RN I	RN I	
	+++	-	-		+++	-	-		+++	-	-
Sérum 1/10	+++	-	-		+++	-	-		+++	-	-
Sérum Bez...				Sérum Sar...				Sérum Bes...			
Agglutinat ⁿ	Avant	Après		Agglutinat ⁿ	Avant	Après		Agglutinat ⁿ	Avant	Après	
RN	640	640			160	160			640	640	
Souche I	320	320			40	40			160	160	
Immune adh.	Avant	Après		Immune-adh.	Avant	Après		Immune-adh.	Avant	Après	
	RN I	RN I			RN I	RN I			RN I	RN I	
	+++	-	-		+++	-	-		+++	-	-
Sérum 1/10	+++	-	-		+++	-	-		+++	-	-

TABLEAU II (suite).

Sérum R1...				Sérum Pri...				Sérum Gif...			
Agglutinat ⁿ	Avant	Après		Agglutinat ⁿ	Avant	Après		Agglutinat ⁿ	Avant	Après	
RN	320	320			160	80			640	320	
Souche I	160	160			320	320			320	320	
Immune-adh.	Avant	Après		Immune-adh.	Avant	Après		Immune-adh.	Avant	Après	
	RN I	RN I			RN I	RN I			RN I	RN I	
Sérum 1/10	+++	++	-		+++	+++	-		+++	++	-
Sérum Gui...				Sérum Mal...				Sérum Per...			
Agglutinat ⁿ	Avant	Après		Agglutinat ⁿ	Avant	Après		Agglutinat ⁿ	Avant	Après	
RN	640	320			320	320			1280	320	
Souche I	160	80			-	-			20	20	
Immune-adh.	Avant	Après		Immune-adh.	Avant	Après		Immune-adh.	Avant	Après	
	RN I	RN I			RN I	RN I			RN I	RN I	
Sérum 1/10	++++	++	-		+++	+++	-		+++	++	-

Ces résultats suggéraient qu'un antigène, probablement non protidique et différent de l'agglutinogène, était responsable de l'immune-adhérence.

Les cinq dernières souches en expérience ont également été papainisées avec de la papaine du commerce.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE. — Il s'agit de la papaine Prolabo, titre 80. On en prépare une solution à 5 p. 100 que l'on filtre sur papier. Le filtrat est centrifugé ; le surnageant est ramené à pH 8.

On réalise dans 3 ml d'eau physiologique une émulsion d'une culture bactérienne de vingt-quatre heures sur gélose ; 2 ml de cette émulsion sont lavés trois fois ; le culot bactérien lavé est remis en suspension en eau physiologique au volume initial de 2 ml. Cette suspension est mélangée avec 2 ml de la solution de papaine à pH 8. Le mélange est mis au bain-marie une heure à 37°, puis chauffé quinze minutes à 100° pour détruire la papaine restante. Les bactéries papainisées sont lavées trois fois et remises en suspension finale en eau physiologique au volume de 1 ml.

Notons ici que nous avons vu, au cours d'expériences préliminaires répétées dix fois, que le chauffage des staphylocoques à 100° pendant quinze minutes ne modifie en rien l'immune-adhérence.

Les résultats obtenus avec les 5 souches ainsi papainisées montrent que, ici encore, l'immune-adhérence persiste ; mais l'interprétation des effets directs sur l'agglutinogène est impossible du fait de la présence d'agglutinats spontanés dans les 5 cas.

II. — EFFETS DE L'ABSORPTION DES SÉRUMS PAR LES STAPHYLOCOQUES SECS PAPAÏNISÉS.

Nous avons ensuite effectué une série d'expériences parallèles portant sur 12 sérums. Ces sérums ont été absorbés à l'aide de staphylocoques secs préalablement papainisés.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE. — 300 mg de staphylocoques secs sont mis en suspension dans 10 ml de la solution de papaine Prolabo à pH 8. La suspension est mise en bain-marie une heure à 37°, puis chauffée à 100° pendant quinze minutes. Les bactéries papainisées sont alors lavées trois fois, puis sont utilisées pour absorber le sérum ; le culot bactérien papainisé et lavé est mis en suspension dans 2 ml de sérum dilué au 1/10. Ce mélange est placé à l'étuve à 37° pendant une demi-heure, puis centrifugé ; le surnageant sérique absorbé est recueilli.

Nous avons alors déterminé les taux d'agglutination de ces 12 sérums absorbés et des mêmes sérums non traités comme témoins. A noter qu'une des deux souches en expérience ne fut pas agglutinée par l'un des sérums (Mal...).

Nous avons également effectué les tests d'immune-adhérence avec ces mêmes sérums absorbés et non absorbés. Nous devons

noter que nous avons observé, dans quelques cas, une lyse partielle des hématies dans les préparations faites avec les sérums absorbés. Nous ne pouvons expliquer avec certitude la cause de cette lyse, mais elle n'a en rien modifié la netteté des résultats consignés dans le tableau II ; on sait d'ailleurs [1, 3, 4] que la lyse globulaire totale n'empêche nullement l'immune-adhérence.

Quoi qu'il en soit, les résultats obtenus avec ces 12 sérums montrent que le taux d'agglutination n'est pas, ou pratiquement pas modifié par l'absorption avec les bactéries sèches papainisées et que, au contraire, l'immune-adhérence disparaît avec les sérums absorbés.

CONCLUSIONS.

De ces deux séries d'expériences complémentaires, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° L'immune-adhérence du staphylocoque semble être le fait d'un système antigène-anticorps différent du système agglutino-gène-agglutinine.

2° L'antigène responsable de l'immune-adhérence n'est pas détruit par la papaine et par conséquent ne serait probablement pas de nature protidique.

SUMMARY.

From these two complementary series of experiments the following conclusions have been inferred :

1° The immune-adhesion of the staphylococcus appears to be based upon an antigen-antibody system different from the agglutino-gen-agglutinin system.

2° The antigen responsible for the immune-adhesion is not destroyed by papain, and consequently, is probably not of a protein nature.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. KOURILSKY, R. PIERON, S. KOURILSKY, R. ROBINEAUX et G. VOISIN. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 274.
- [2] J. PILLET, M. ROUYER et B. ORTA. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 662.
- [3] R. A. NELSON Jr. *Science*, 1953, **118**, 733.
- [4] R. ROBINEAUX et R. A. NELSON Jr. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 254.

ACTION PARTIELLEMENT INHIBITRICE DU BOUILLON NUTRITIF SUR LA CROISSANCE DE *PASTEURELLA PESTIS*

par GEORGES GIRARD (*)
avec la collaboration technique d'ANDRÉ CHEVALIER.

(Institut Pasteur, Service de la Peste)

Nous avons rapporté en 1944 [1] que, si le bouillon convient parfaitement à la culture du bacille pesteux à condition que celui-ci soit largement ensemencé, il en va tout autrement avec de faibles inoculats. Nous avons été conduit à substituer l'eau peptonée au bouillon, en choisissant certaines peptones telles que la marque « Uclaf » qui a permis à Y. Tchan [2] de réaliser la culture de *P. pestis* à partir d'une cellule prélevée au micromanipulateur (1). Mais nous soulignons aussi que l'addition de sang, et, à un moindre degré, de sérum, favorisait le départ de la culture dans le bouillon ensemencé avec les suspensions les plus diluées de *P. pestis*. Notre objectif était alors de rechercher si, dans la pratique du dépistage de la peste par l'hémoculture, on risquait d'échouer à isoler l'agent étiologique en se servant de bouillon ordinaire. Comme le sang humain, le sang de lapin et même le sang de cobaye vacciné et ayant résisté à la peste expérimentale se révélaient également favorables, nous en concluons que l'hémoculture devait toujours permettre de mettre en évidence le bacille pesteux dans le sang, quelle que soit la discrétion de la bactériémie. Sur gélose, nous avons fait les mêmes constatations qu'en bouillon et, pour nos recherches courantes, nous n'utilisons plus que la gélose peptonée (Uclaf ou PTV) et non la gélose nutritive classique.

De son côté, S. Sokhey [3] a montré qu'en bouillon la phase de latence de croissance de *P. pestis* est notablement réduite si l'on emploie, au lieu de bouillon neuf, un filtrat de jeune culture de peste dans ce même bouillon. Nous avons, avec J. Gallut [4], confirmé les résultats de Sokhey et vu que les filtrats de culture âgée convenaient aussi bien que ceux des cultures de six heures,

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 octobre 1955.

(1) Nous avons reconnu depuis que la peptone PTV (digestion pancréatique de muscle) et la bactopectone Difco sont aussi favorables.

et qu'il était possible d'y provoquer la croissance d'inoculats réduits qui, dans le bouillon témoin, étaient parfois incapables de se développer.

Pour Sokhey, les filtrats ont pour effet d'enrichir le milieu en éléments provenant de la lyse microbienne, et qui sont indispensables au démarrage des cultures. Avec desensemencements massifs de l'ordre de centaines de milliers de cellules ou plus, cette lyse initiale se produit, mais laisse assez de germes intacts qui mettent à profit cet apport de facteurs favorisants pour se multiplier en bouillon.

Nous ne pensons plus aujourd'hui que cette interprétation à laquelle nous avons tout d'abord souscrit soit exacte. Ce n'est pas par carence d'éléments nutritifs ou de facteurs accessoires que le bouillon s'oppose à la croissance de faibles inoculats de *P. pestis*, mais parce qu'il contient des substances inhibitrices qui sont neutralisées en tout ou en partie par le sang, le sérum ou les *lysats* du microorganisme. Les expériences que nous rapportons confirment, en ce qui concerne *P. pestis*, celles de A. Lwoff [5] relatives au développement de *Moraxella lacunata* et de *Neisseria gonorrhoeae* dans certains bouillons peptonés qui ne permettent la croissance de ces germes que s'ils sont additionnés de sérum, de cholestérol, ou simplement dilués avec de l'eau, ces modifications ayant pour effet de neutraliser des substances inhibitrices ou de diminuer leur concentration.

DONNÉES EXPÉRIMENTALES.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE. — Nous avons utilisé, répartis en tubes inclinés de 18/18 mm :

a) La gélose nutritive (bouillon de viande de bœuf + 20 p. 1000 de peptone PTV ; NaCl, 5 p. 1 000, gélose, 25 p. 1 000).

b) Le même milieu additionné de 10 p. 100 de sang de lapin ou de mouton.

c) La gélose peptonée PTV, avec ou sans addition de sang, qui ne diffère des précédents que par l'absence de bouillon.

Tous lesensemencements ont été faits avec la souche de *P. pestis* avirulente EV. Une trace de culture de quarante-huit heures à 27° C sur gélose était émulsionnée soigneusement dans 10 ml d'eau salée physiologique de façon à avoir une suspension nettement opalescente et très homogène avec laquelle on effectuait des dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-6} . Une longue pratique nous a depuis longtemps enseigné que, dans de telles conditions, l'étalement d'une anse (1/300 de millilitre) de suspension donnait une culture en nappe avec 10^{-1} , des colonies nombreuses et trop rapprochées pour être dénombrées avec 10^{-2} , des colonies isolées en nombre décroissant avec les dilutions de 10^{-3} à 10^{-6} . C'est

cette technique qui a été suivie, et l'on a comparé l'aspect des tubes des milieux définis plus haut après trois et huit jours d'incubation à 27° C. On a pris soin d'enlever à la pipette l'excès d'eau de condensation pour prévenir des auto-ensemencements secondaires, notamment dans le tiers inférieur des tubes.

RÉSULTATS.

Les résultats s'expriment dans les figures de la planche qui nous dispenseront de longs commentaires. On ne note pas de différence dans la moyenne des colonies qui se sont développées sur les milieux B et C. Par contre, sur les tubes du milieu A, une seule colonie a poussé avec la dilution 10^{-2} et aucune avec les dilutions suivantes qui ont, comme nous l'escomptions, permis le développement de plusieurs colonies avec la dernière dilution expérimentée, 10^{-5} , sur les milieux B et C. En bref, avec la gélose nutritive, *qui contient cependant la même quantité de peptone PTV que la gélose peptonée sans bouillon*, 1 germe seulement sur 1 000 vivants s'est multiplié. On ne peut trouver de meilleure preuve de l'action inhibitrice exercée par le bouillon sur la culture de *P. pestis*.

DISCUSSION.

Il y a bien longtemps que E. Dujardin-Beaumetz nous avait dit qu'il était très difficile d'obtenir des colonies bien isolées de *P. pestis* sur gélose : ou bien il ne poussait rien si la semence était trop faible, ou bien les colonies étaient confluentes avec des inoculats plus denses. Au laboratoire de la peste, les milieux solides ou liquides étaient à base de macération de viande de bœuf additionnée d'un volume égal de peptone Martin ou de 20 g par litre d'une peptone commerciale. En revanche, la gélatine nutritive donnait à ce point de vue pleine satisfaction, bien qu'elle ne différât des précédents milieux que par la substitution de la gélatine à la gélose. R. Devignât (communication personnelle) a toujours, lui aussi, utilisé avec succès la gélatine pour dénombrer les germes viables d'une suspension donnée de *P. pestis*. Aussi nous sommes-nous demandé si la gélatine n'avait pas, comme le sang ou le sérum, le pouvoir de neutraliser les substances empêchantes du bouillon ; ce que l'expérience a confirmé. Nous avons préparé une gélatine nutritive selon la formule de notre milieu A, où la gélose était remplacée par 150 p. 1 000 de gélatine. En boîte de Petri, 1 goutte de dilution de *P. pestis* incapable de croître sur le milieu A original a provoqué, après étalement, le développement de colonies en nombre sensiblement égal à celui fourni par la gélose peptonée ; on

a seulement noté un léger retard dans l'apparition des colonies sur gélatine, bien que les boîtes aient été de part et d'autre laissées à la température du laboratoire, 20° C environ.

Ajoutons que l'addition de sang à la gélose peptonée n'apporte aucun élément favorable à ce milieu qui se suffit à lui-même ; elle ne lui est pas davantage nuisible.

Il était intéressant de rechercher si l'effet inhibiteur du bouillon de bœuf s'exerçait aussi vis-à-vis de *Pasteurella pseudotuberculosis* en raison des affinités entre ce microorganisme et *P. pestis*. Il n'en est rien. Les milieux A, B et C se sont comportés de façon identique avec un chiffre de colonies du même ordre après ensemencement des dilutions limites 10⁻⁵ et 10⁻⁶ de densité analogue à celle de *P. pestis*, et en suivant la même technique.

Il n'est guère douteux qu'en préconisant la gélose-sang comme milieu électif pour la culture de *P. pestis*, Sokhey envisageait les cas où la présence de rares unités microbiennes dans un matériel suspect serait méconnue si l'ensemencement était effectué sur simple gélose nutritive. Les photographies dues à cet auteur et qui illustrent le récent ouvrage de R. Pollitzer [6] attestent à dessein ce contraste. Comparées à celles du présent travail, leur analogie est frappante, mais c'est par la suppression du bouillon que nous parvenons aux mêmes résultats que Sokhey, et non par addition de sang.

Dans la pratique où, en dehors des hémocultures, l'on peut être appelé à rechercher le bacille pesteux dans des lésions chroniques où il est généralement très rare chez l'homme ou chez le rat, ou encore au cours d'enquêtes épidémiologiques sur le terrain comme celles qui sont conduites actuellement dans l'Inde sur les instigations de M. Baltazard dans la prospection de la peste des rongeurs sauvages, il n'est pas sans intérêt de disposer d'un milieu aussi facile à préparer que l'eau peptonée gélosée. Toutes les peptones ne sont certes pas équivalentes ; nous en avons retenu trois marques, mais cette liste n'est pas limitative. Il est possible que certaines peptones, qui ne conviennent pas à la croissance de *P. pestis*, contiennent comme le bouillon des substances inhibitrices, comme Lwoff [5] l'a rapporté à propos de la culture du bacille de Morax qui ne se développe pas plus en eau peptonée qu'en bouillon de viande peptoné, mais ce problème est resté en dehors de nos préoccupations.

RÉSUMÉ.

Le bouillon peptoné qui est à la base de la gélose nutritive contient des substances inhibitrices de la croissance de *P. pestis*,

à moins qu'il soit procédé à de larges ensemencements. Ces substances sont neutralisées par l'addition de sang ou de sérum. Mais la suppression dans la gélose nutritive du bouillon lui-même aboutit à un résultat pratique analogue, le milieu se trouvant alors composé de simple gélose peptonée. On réalise ainsi, aux moindres frais, avec certaines marques de peptone, un milieu qui a la valeur de la gélose au sang et sur lequel le bacille pesteux pousse à l'unité, alors qu'il faut au moins 1 000 cellules pour obtenir une culture sur la gélose nutritive qui compte pourtant, dans sa composition, les mêmes doses de peptones favorables.

SUMMARY.

Peptone broth, basis of nutrient agar, contains substances which inhibit the growth of *P. pestis*, unless a large inoculum is used. These substances are neutralised by the addition of blood or serum. But the omission of the broth in the nutrient agar produces an analogous result, the medium being then composed of peptone agar. One obtains therefore at a lower cost, with certain types of peptone, a medium which is of the same value as blood-agar and upon which the bacillus will develop from a single cell, whereas at least 1 000 cells are required to obtain a culture on nutrient agar, although this contains the same favourable amount of peptone.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. GIRARD. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1944, **37**, 328-331.
- [2] Y. T. TCHAN. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1949, **42**, 89-91.
- [3] S. S. SOKHEY. *Bull. O. M. S.*, 1952, **6**, 65-72.
- [4] G. GIRARD et J. GALLUT. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 372-376.
- [5] A. LWOFF. *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 735-740.
- [6] R. POLLITZER. *Plague*, Monograph series n° 22, W. H. O. Genève, 1954, p. 84-85 (p. 89-90 dans l'édition française).

LÉGENDE DE LA PLANCHE

Etalement d'une anse de suspension de *P. pestis* en dilutions de 10^{-2} à 10^{-5} sur les milieux :

A. Gélose nutritive (bouillon + 20 p. 1 000 de peptone PTV).

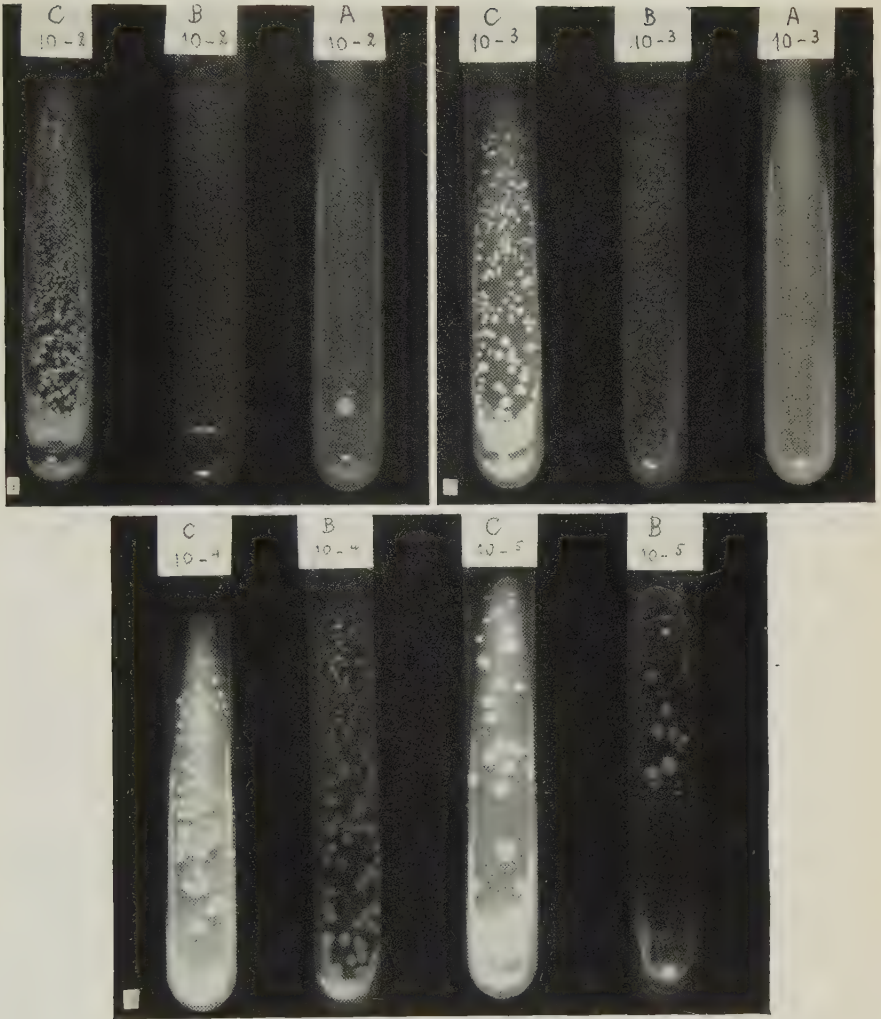
B. Milieu A + 10 p. 100 de sang défibriné.

C. Gélose peptonée PTV à 20 p. 1 000 (absence de bouillon).

FIG. 1. — Dilution 10^{-2} .

FIG. 2. — Dilution 10^{-3} .

FIG. 3. — Dilution 10^{-4} et 10^{-5} . Aucune colonie n'ayant cultivé sur le milieu A dès la dilution 10^{-3} , les deux tubes correspondants ont été enlevés pour ne pas surcharger la planche.



ÉTUDE MORPHOLOGIQUE DE LA CELLULE POLIOMYÉLITIQUE AU STADE INITIAL DE L'INFECTION (*)

par P. LÉPINE (**), O. CROISSANT (**) et R. W. G. WYCKOFF (***) (****).

La poursuite de nos recherches sur le développement des virus neurotropes [1, 2] nous a conduits à étudier le développement du virus poliomyélitique dans le névraxe de la souris, animal qui nous a déjà donné un matériel de choix dans les recherches sur le virus rabique et le virus herpétique. Le présent travail rapporte nos premières observations qui ont porté sur l'examen au microscope électronique de souris adultes ou de souriceaux, inoculés soit avec des souches du type 2 (Polio Lansing, MEF1) ou du type 1 adapté (souche 531185 de l'Institut Pasteur).

Nous avons déjà décrit ailleurs [4] notre méthode expérimentale comportant la perfusion (1), le prélèvement et la fixation des tissus névraxiques en vue de l'exécution de coupes fines et de leur examen au microscope électronique. Comme nous l'avons fait pour la rage et l'herpès, nous avons cherché à déceler au microscope électronique les progrès de l'infection dans le système nerveux d'animaux sacrifiés successivement à des intervalles rapprochés après inoculation intracérébrale. Toutes les expériences et tous les prélèvements ont naturellement comporté des témoins, le matériel prélevé étant contrôlé au moyen des méthodes histologiques classiques tant pour l'aspect des lésions que pour leur topographie.

L'étude de la poliomyélite dans les tissus des animaux infectés comporte quelques facteurs qui facilitent la recherche du virus et un certain nombre qui la rendent au contraire particulièrement difficile. Parmi les premiers facteurs, il faut mentionner

(*) Travail exécuté pour partie avec l'aide de la National Science Foundation, Washington, D. C.

(**) Service des Virus, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris (XV^e), France.

(***) Laboratory of Physical Biology, National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland.

(****) Manuscrit reçu le 15 septembre 1955.

(1) Cette série d'expériences a été exécutée avec la collaboration technique de Louis Chaumont qui a réalisé les perfusions *in vivo*.

surtout le fait que l'on a déjà observé et photographié les particules infectieuses du virus dans des préparations de matériel purifié [3, 4, 5]. De ce fait, et au contraire de ce qui se passe avec le virus de la rage et celui de l'herpès, nous avons une idée précise de la taille et de la morphologie du virus, ce qui doit faciliter grandement son identification dans les cellules infectées. Par contre, si les localisations anatomiques de l'infection polio-myéлитique à la colonne motrice du névraxe facilitent dans une certaine mesure le prélèvement du matériel infectieux, nous n'assistons pas dans la poliomyélite au développement d'inclusions cellulaires caractéristiques qui permettent de reconnaître au microscope classique (photonique) les cellules atteintes comme cela se fait de façon aisée dans les infections rabique et herpétique. D'autre part, les contrôles d'infectiosité du matériel examiné démontrent que le névraxe tout entier des souris inoculées avec les souches que nous avons utilisées renferme du virus, parfois en grande abondance. Ce fait, et la quantité même de virus que l'on peut extraire des tissus, spécialement chez le souriceau, conduisent à admettre que l'infection est généralisée. Nous avons pris comme indication visible de l'infection d'un tissu, lors du contrôle de celui-ci par les méthodes histologiques, l'infiltration intense par des leucocytes que l'on observe autour de certains groupes de cellules de l'axe moteur réalisant le tableau classique des nodules infectieux avec neuronophagie, mais il est évident que, même avec du matériel prélevé dans des régions anatomiques présentant ce tableau typique et classique, on ne peut être sûr *a priori* qu'un neurone en particulier, observé au microscope électronique, renferme effectivement le virus.

Au cours de cette première étape de l'étude du développement du virus, nous avons centré notre attention sur la recherche du virus dans les cellules de la substance grise de la moelle et du bulbe. Ayant à rechercher des particules d'un diamètre d'environ 300 Å, nous avons choisi de travailler avec des coupes relativement épaisses pour ne pas être gênés au cours de cette recherche par la présence de particules sectionnées ou arrachées de leur siège. Comme nous l'avons déjà signalé [1, 2], l'utilisation de ces coupes relativement épaisses a l'avantage supplémentaire, outre le fait qu'elles restituent les rapports topographiques du virus et des structures cellulaires, de rendre particulièrement évidents les dommages survenus aux tissus au cours de leur préparation ou pendant l'examen au microscope électronique.

RÉSULTATS.

Il n'est pas difficile de rencontrer, dans le noyau des neurones ou des autres cellules présentes dans les tissus infectés, de nom-

breuses particules ayant la taille et la forme de celles qui ont été vues à l'examen des préparations de virus purifié. Aussi le problème ne consiste-t-il pas à trouver des particules ressemblant au virus, mais à identifier parmi les particules celles qui correspondent réellement aux corpuscules en voie de développement.

La figure 1 montre, dans un cerveau de souris au début de l'infection poliomyélitique, un champ typique d'une de nos préparations examinées à un faible grossissement. On y reconnaît quelques grandes cellules au milieu d'un entrelac de petites fibres nerveuses pour la plupart myélinisées. Les noyaux des neurones présentent des contours irréguliers et un nucléoplasme dont la structure est anormalement granuleuse. En dehors de ces modifications de la structure fine, l'aspect général du tissu est parfaitement normal, au microscope électronique comme au microscope ordinaire. On rencontre fréquemment des cellules dont le noyau présente une margination de la chromatine comme celle que l'on observe dans la partie droite de la figure 1. Certains de ces aspects correspondent aux noyaux normaux des cellules gliales de la substance grise. D'autres sont ceux des leucocytes qui ont envahi les tissus et quelques-uns peuvent correspondre au noyau de cellules infectées. Le caractère granuleux des noyaux vus dans les tissus infectés de poliomyélite, tels qu'on l'observe sur les figures 2, 3 et 4, contraste avec l'aspect à prédominance fibreuse du réticulum nucléaire des noyaux normaux.

Les figures 5 et 6 nous montrent des vues partielles de noyaux à un grossissement plus élevé encore. On voit que leur contenu se compose pour la plus grande part de corpuscules sphériques, distribués en unités isolées, en chaîne ou en amas, et qui ont un diamètre d'environ 300 Å. Nous avons comparé des micrographies analogues à celles-ci avec celles de virus purifié prises au même grossissement. L'analogie de structure est frappante, la seule différence résidant dans une meilleure définition des particules individuelles sur le matériel purifié, nécessairement plus propre. Il est important de signaler que nous avons jusqu'ici examiné plusieurs centaines de préparations sans y rencontrer d'autres amas de particules ayant la taille reconnue au virus. De ce fait, il nous paraît nécessaire de conclure : ou bien que les particules intranucléaires visibles sur nos micrographies correspondent bien au virus en voie de développement, ou bien qu'aucune cellule infectée n'a été comprise dans tous les blocs de tissus poliomyélitiques et dans le grand nombre de coupes que nous avons examiné.

L'existence de particules intranucléaires ayant la taille et la morphologie du virus n'est pas cependant limitée aux cellules manifestement infectées. On en trouve également, quoique moins

nombreuses et moins visibles, dans les cellules saines des mêmes tissus. Dans les cellules normales, ces particules sont prises et enrobées dans les mailles du réseau nucléoplasmique avec ses autres constituants. De ce fait, il est impossible de dire si leur nombre est plus grand dans les cellules malades que dans le noyau normal. Il est très possible que ces corpuscules soient simplement libérés lorsque l'infection entraîne la désintégration des autres composants du réticulum nucléaire. La plupart des particules que l'on voit dans les cellules malades sont distribuées comme si elles étaient formées de résidus du réseau nucléaire. Quand on les rencontre en amas, elles ont la forme générale et occupent la position des nucléoles ou autres amas chromatinien. Il est intéressant de noter que d'autres virus, comme l'herpès, qui attaquent également les cellules nerveuses, peuvent aussi entraîner la formation de noyaux contenant des particules ayant cette même taille.

Cette identité morphologique entre les corpuscules du virus de la poliomyélite et les particules d'un composant normal du protoplasme nucléaire, associée à l'absence dans les cellules d'autres particules ayant la dimension du virus, comporte un enseignement touchant à la nature probable des éléments virulents.

Nos observations suggèrent, en effet, qu'au cours de l'infection, ou bien le composant particulaire normal des cellules subit dans sa nature chimique une altération qui le rend infectieux, ou bien qu'il est remplacé par des particules morphologiquement identiques mais qui sont infectieuses.

SUMMARY.

An electron microscopic study has been made of sections cut through the hind brain and spinal cord of mice and suckling mice diseased with poliomyelitis. The nuclei of some of the cells in these tissues reveal, instead of the usual nuclear net, large numbers of particles the size of virus. In similar cells of healthy animals a few particles of this size can be seen entangled in the nuclear net. This suggests that, during infection, these normal particles may change into or be replaced by the particles of virus and that these may become liberated through disintegration of the normal nuclear texture.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] O. CROISSANT, P. LÉPINE et R. W. G. WYCKOFF. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 183.
- [2] R. W. G. WYCKOFF, P. LÉPINE et O. CROISSANT. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 18.

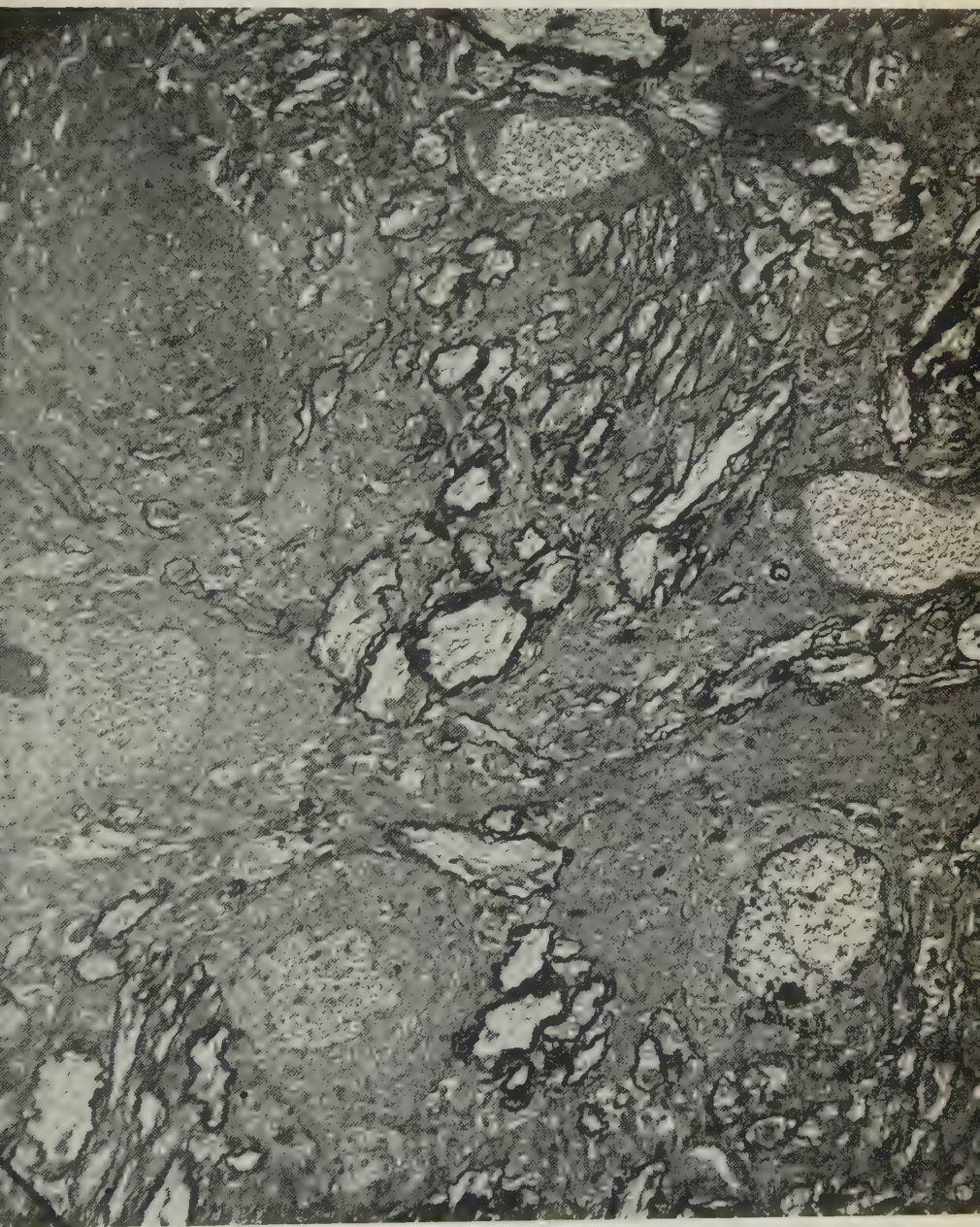


PLANCHE I (FIG. 1).

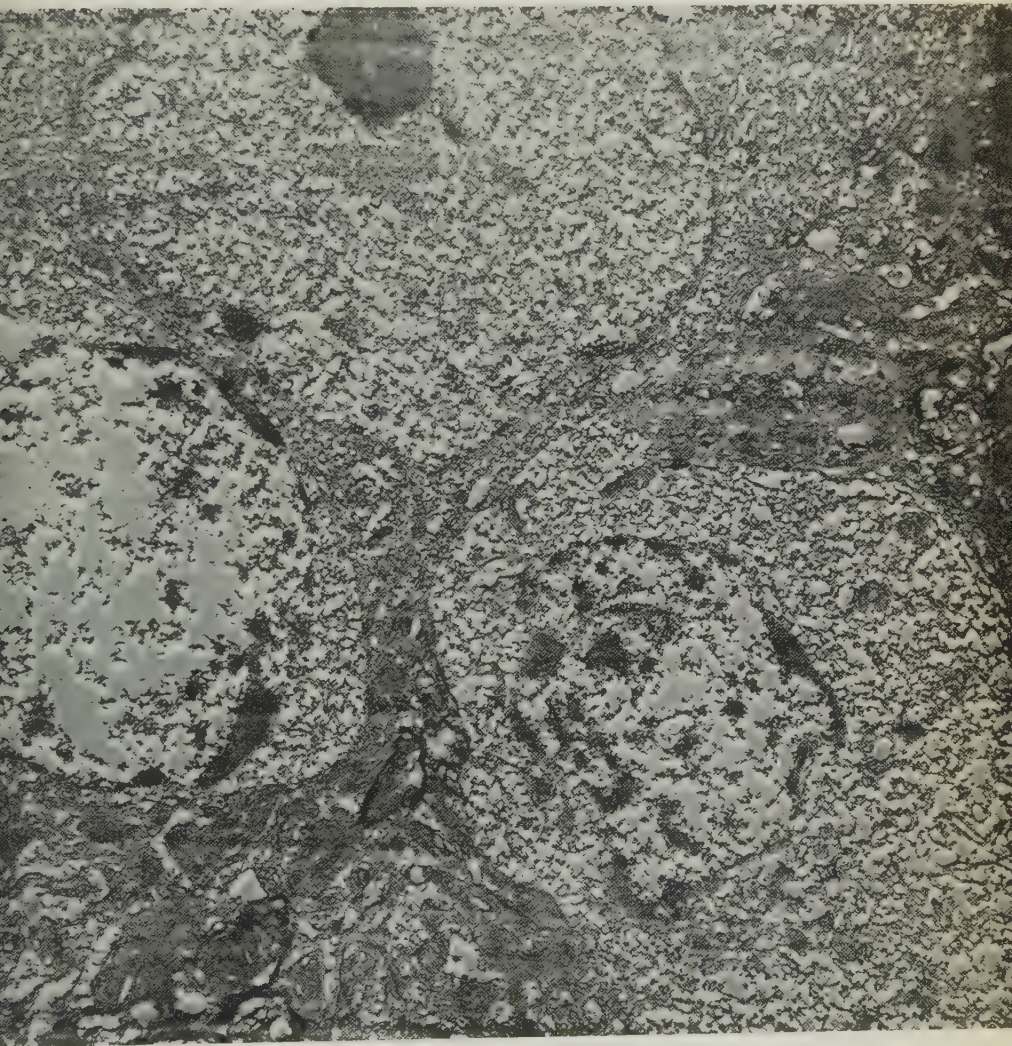


PLANCHE II (FIG. 2).



PLANCHE III (FIG. 3).



PLANCHE IV. (FIG. 4).

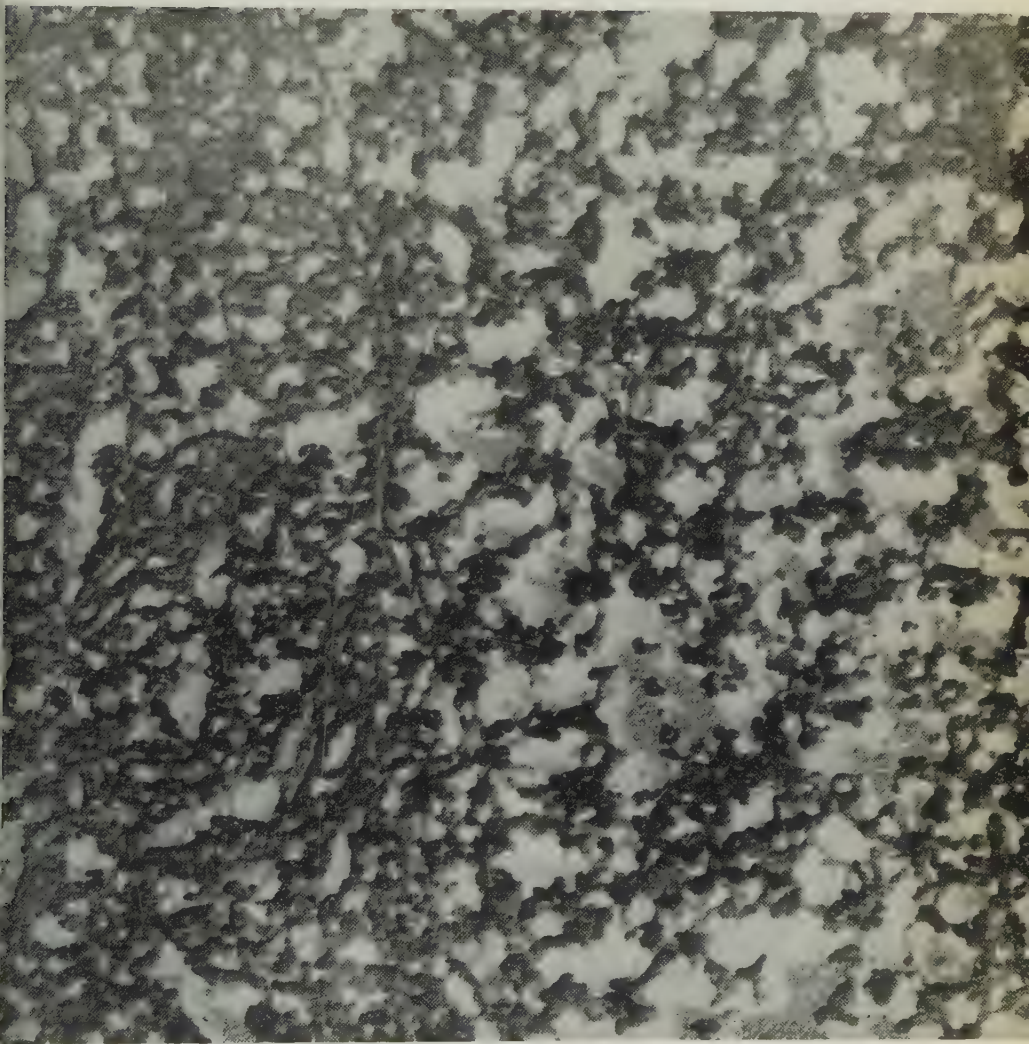


PLANCHE V (FIG. 5).

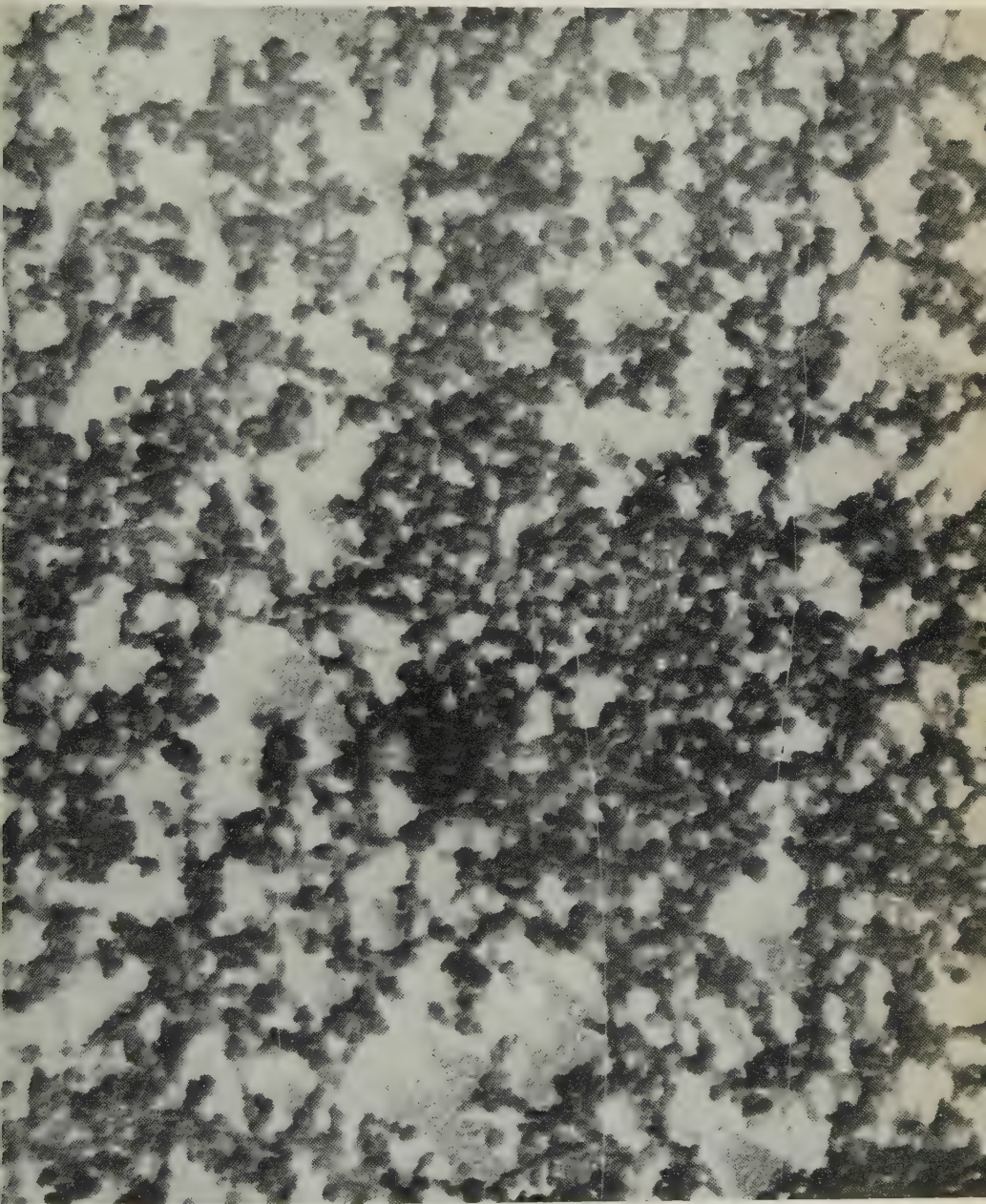


PLANCHE VI (FIG. 6).

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

- [3] H. L. BACHRACH et C. E. SCHWERDT. *J. Immunol.*, 1954, **72**, 30.
 [4] C. E. SCHWERDT, R. C. WILLIAMS, W. M. STANLEY, F. L. SCHAFER
 et M. E. McCLAIN. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1954, **86**, 310.
 [5] C. E. SCHWERDT et F. L. SCHAFER. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1955,
61, 740.

LÉGENDES DES PLANCHES

FIG. 1. — Micrographie à un faible grossissement d'une coupe mince de tissu du bulbe d'une souris infectée. Il y a quatre neurones à gauche et en bas. En haut et à droite deux petits capillaires. 3 800 x.

FIG. 2. — Noyaux de trois cellules du bulbe d'une souris infectée, vus à un grossissement plus élevé. La chromatine des deux noyaux situés en bas est fortement marginée ; tous les trois ont une structure granuleuse. 6 100 x.

FIG. 3. — Noyau granuleux à chromatine marginée à un grossissement plus élevé. 13 000 x.

FIG. 4. — Noyau granuleux d'un neurone de souris infectée avec le virus poliomyélitique. 9 700 x.

FIG. 5. — A droite, partie du noyau d'un neurome infecté rempli de particules ayant les dimensions du virus. A gauche, du cytoplasme cellulaire. 32 000 x.

FIG. 6. — Vue d'une partie du noyau d'une cellule infectée au fort grossissement. Ce noyau consiste en particules d'un diamètre d'environ 300 Å. 60 000 x.

ÉTUDE AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE DES LÉSIONS NÉVRAXIQUES INTRACELLULAIRES CAUSÉES PAR LE VIRUS HERPÉTIQUE (*)

par R. W. G. WYCKOFF (**), O. CROISSANT (***) et P. LÉPINE (****) (****).

L'étude au microscope électronique du virus herpétique présente un intérêt particulier. En effet, ce virus est d'une taille et d'une structure qui se prêtent parfaitement à l'examen au microscope électronique et il a, d'autre part, été déjà l'objet de nombreuses recherches au microscope ordinaire (photonique) parce qu'il engendre dans les cellules des lésions spécifiques qui peuvent être facilement reconnues et suivies au moyen des techniques histologiques usuelles. De plus, le virus herpétique n'ayant pas une stricte spécificité zoologique, il peut être aisément cultivé sur plusieurs types de tissus appartenant à différentes espèces animales. C'est la raison pour laquelle nous avons inclus ce virus parmi ceux que nous avons adoptés dans notre programme actuel de recherches sur le développement intracellulaire des virus neurotropes.

La diversité des tissus sensibles au virus permet d'obtenir, après infection par le virus herpétique, un matériel se prêtant à l'examen au microscope électronique en partant soit des cellules infectées de membranes chorio-allantoïdes d'œufs incubés, soit du tissu nerveux ou d'autres tissus provenant de différentes espèces d'animaux. On peut ainsi attendre de l'examen comparé d'un grand nombre de cellules appartenant à des tissus aussi divers une meilleure connaissance du virus et de son développement intracellulaire.

Plusieurs études au microscope électronique déjà publiées ont montré l'aspect que présentent les cellules infectées par le virus herpétique. Les plus récentes d'entre elles décrivent la croissance du virus dans les cultures de tissus de singe et dans les mem-

(*) Travail exécuté pour partie avec l'aide de la National Science Foundation, Washington, D. C.

(**) Laboratory of Physical Biology, National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland.

(***) Service des Virus, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris (XV^e), France.

(****) Manuscrit reçu le 4 octobre 1955.

branes chorio-allantoïdes d'embryons de poulet [1, 2]. Le présent travail rapporte les observations faites en employant pour matériel d'étude le tissu cérébral de lapins et de souris infectés avec le virus herpétique.

Dans le névraxe et dans le cerveau en particulier, les zones affectées par les lésions herpétiques sont très limitées, et nous n'aurions pu procéder à nos observations au microscope électronique sans la connaissance préalable des lésions visibles au microscope ordinaire. Nous devons cette dernière à un grand nombre de travaux poursuivis à la suite de la première description des inclusions intracellulaires spécifiques par Lipschütz [3], et en particulier aux études aujourd'hui classiques de C. Levaditi [4] et de son école. Celles-ci ont rendu possible la sélection des zones électives de l'encéphale les plus susceptibles de contenir le virus, ce qui donne une excellente occasion de comparer les lésions anatomo-pathologiques par l'observation des mêmes régions au moyen des deux types de microscope relevant l'un de l'optique photonique et l'autre de l'optique électronique.

En fait, le microscope électronique ne nous montre que quelques-uns des stades de l'infection telle qu'elle est classiquement décrite au microscope ordinaire ; mais les différences constatées entre les données des deux types d'instrument nous apportent de précieux renseignements. Nous nous proposons de les discuter après avoir au préalable procédé à une étude méthodique et détaillée de la croissance du virus dans différentes conditions expérimentales.

DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL.

Des lapins, des souris et des souriceaux ont été inoculés par voie intracérébrale avec la souche d'herpès 5433, isolée et entretenue à l'Institut Pasteur.

Au moment où les souris adultes et les lapins inoculés présentaient des symptômes indiscutables de la maladie, ils ont été, après anesthésie et inhalation de nitrite d'amyle, perfusés avec une solution d'acide osmique selon la technique précédemment décrite [5] (1).

Des portions de cerveaux découpées par microdissection au niveau des zones électives ont été immédiatement prélevées et placées pendant douze à vingt-quatre heures dans une solution d'acide osmique tamponnée, maintenue à 0°, pour compléter la fixation. En même temps que les animaux perfusés, d'autres animaux inoculés dans les mêmes conditions et présentant les mêmes symptômes ont été sacrifiés. Leurs cerveaux, immédiate-

(1) Les perfusions ont été faites avec la collaboration technique de Louis Chaumont, qui a contribué à la mise au point de la méthode.

ment fixés dans le Bouin, ont été examinés selon la technique histologique classique pour contrôler l'existence des lésions. Des prélèvements de cerveau frais ont servi à titrer et à vérifier l'infectivité du matériel. Enfin des fragments du matériel perfusé et fixé à l'acide osmique, portant sur les mêmes régions que celles soumises à l'examen au microscope électronique, ont été inclus en paraffine, examinés au microscope optique pour vérifier l'identité des lésions et leur état d'avancement par rapport à celles des lapins témoins.

Dans le cas des souriceaux, le cerveau des animaux malades a été traité de la même manière, exception faite de la perfusion. L'encéphale a été, dès prélèvement effectué à basse température avec un matériel refroidi, divisé en deux parties égales, placées l'une à 0° C dans la solution tamponnée d'acide osmique, l'autre dans le Bouin.

Pour l'examen histologique, le matériel a été déshydraté, inclus en paraffine, coupé et coloré à l'hémalum-éosine selon la technique normale. Pour l'examen au microscope électronique, les méthodes habituelles ont été suivies jusqu'à l'inclusion dans le métacrylate. Le matériel inclus a été coupé à l'épaisseur désirée au moyen du microtome de Porter-Blum ou du microtome de Minot modifié. Les observations ont été faites soit au microscope RCA EMU 2, soit au microscope Philips à 75 kv.

Il est aujourd'hui possible d'obtenir des coupes de tissus assez fines pour que leur examen au grossissement élevé du microscope électronique puisse être pratiqué sans perte excessive de résolution. La plupart des chercheurs utilisent actuellement en microscopie électronique la technique des coupes ultra-fines. Néanmoins, de telles coupes ne peuvent guère dépasser l'épaisseur de 0,1 μ , et de ce fait, elles ne contiennent inévitablement que de très petits fragments d'éléments discontinus compris dans le plan de coupe du tissu soumis à l'examen, dont nous n'observons en réalité que les structures résiduelles après fixation. Pour l'étude de certains problèmes il est important de pouvoir examiner des coupes comparativement plus épaisses. Ceci est particulièrement vrai lorsque, comme dans le cas présent, on désire étudier les caractéristiques de particules intactes du virus ou des groupes de ces particules, ainsi que leurs rapports spatiaux avec les constituants cellulaires et les modifications de structure qui accompagnent leur développement.

Les résultats décrits ici ont été obtenus avec des coupes de ce type relativement épaisses, parce qu'elles mettent en évidence la topographie des lésions ainsi que les aspects de l'infection herpétique qui ne peuvent être observés sur des coupes plus fines. En revanche, elles ne nous apportent que peu de précisions sur les structures macro-moléculaires des composants cellulaires et

des particules élémentaires du virus. Ces coupes sont deux à trois fois plus épaisses que les coupes les plus fines couramment obtenues aujourd'hui. Dans ces conditions, il est essentiel d'enlever le métacrylate avant de les observer au microscope électronique pour éviter une dispersion excessive des électrons et la perte de résolution qui en résulte.

Lors de l'exécution des préparations, nous avons suivi la technique usuelle en histologie électronique, notamment en ombrant par métallisation les coupes montées sur grilles, ce qui, tout en augmentant leur stabilité, produit sur les images un effet tridimensionnel qui aide souvent à l'interprétation des détails.

RÉSULTATS.

Il est admis, selon la microscopie classique, que dans les tissus du type de ceux que nous avons examinés le virus atteint de préférence des cellules à grand noyau dans lequel on ne peut mettre en évidence que peu de chromatine. Dans ces cellules, les premières lésions visibles du réseau chromatinien constituent le stade précoce de la lésion herpétique. Un second stade de l'évolution est caractérisé par les cellules dont la chromatine s'est accumulée à la périphérie du noyau, donnant à la membrane nucléaire un aspect moniliforme. Les Anglo-Saxons désignent ces cellules sous le nom de « *marginated cells* » qui traduit bien cette dispersion marginale de la chromatine nucléaire. Nous les désignerons sous le nom de « *cellules à chromatine marginée* ».

A un stade plus avancé de l'infection herpétique, on rencontre, dans la partie centrale du noyau et parfois dans le cytoplasme des cellules atteintes, un matériel ayant les réactions tinctoriales de la chromatine et une réaction de Feulgen positive. Enfin au stade final, l'agglomération du matériel au centre du noyau donne habituellement l'apparence classique des corps d'inclusion. A ce stade terminal, l'oxyphilie du matériel d'inclusion est de règle et les réactions cytochimiques microscopiques donnent une réaction de Feulgen négative.

Il est admis habituellement que le processus infectieux avec ses altérations histologiques correspondantes prend place exclusivement dans les neurones — soit les cellules pyramidales, soit les cellules ganglionnaires — que l'on rencontre aussi bien dans la corne d'Ammon que dans les noyaux de la base situés au voisinage de l'infundibulum et de la scissure rhinale. Néanmoins, on observe constamment, au cours de l'infection herpétique du névraxe, une invasion massive par des leucocytes de diverses espèces comme cela a lieu dans d'autres infections à virus du système nerveux central. Plusieurs auteurs, en particulier Cowdry et Nicholson [6], en se basant sur l'étude histologique des lésions

cytoplasmiques (*minute bodies*), incriminent cependant, dans les processus pathologiques dépendant de la multiplication du virus, les phagocytes, mobiles ou fixés. Nos observations, tout en confirmant dans leurs grandes lignes les descriptions classiques faites au microscope optique, suggèrent en outre qu'une part importante des aspects typiques de l'évolution du virus se situe effectivement dans les cellules qui ont envahi le système nerveux.

Les cellules à chromatine marginée présentant les lésions typiques de l'infection herpétique sont situées, nous l'avons dit, pour la plus grande partie, à la base du cerveau, le long de

LÉGENDES DES PLANCHES

PLANCHE I

FIG. 1. — Souris infectées par voie intracérébrale avec le virus herpétique. Micrographie d'une coupe de tissu faite à la jonction de la substance grise et de la substance blanche au voisinage de l'infundibulum. De nombreuses cellules de la substance grise présentent une margination de la chromatine, concentrée à la périphérie du noyau. A ce stade précoce de l'infection, il est difficile mais non impossible, de voir des amas de particules ressemblant au virus en voie de développement. 4 200 x.

FIG. 2. — Coupe d'un capillaire contenant un leucocyte et deux globules rouges. Comme dans les cellules infectées des précédentes figures et des suivantes, on aperçoit dans le globule blanc une accumulation de la chromatine le long de la membrane basale. 10 300 x.

PLANCHE II

FIG. 3 A. — Coupe d'un groupe de plusieurs cellules infectées vues à un grossissement plus élevé et montrant, mieux que dans la figure 1 les stades précoces du développement de corpuscules ayant l'apparence du virus. 11 400 x.

PLANCHE III

FIG. 3 B. — Même type de lésions vues à un grossissement plus élevé. 19 000 x.

PLANCHE IV

FIG. 4. — Cerveau de souris. Cellule récemment infectée montrant des amas de chromatine à la périphérie de son noyau. Les quelques particules denses distribuées isolément dans l'ensemble du noyau correspondent probablement au premier stade de l'infection. 14 400 x.

FIG. 5. — Cellule semblable à celle de la fig. 4, mais à un stade plus avancé de l'infection. Des particules denses de forme irrégulière forment une grosse grappe dans le haut de la cellule et un groupe plus diffus au centre. 13 600 x.

PLANCHE V

FIG. 6. — Autre cellule infectée montrant un réticulum clairsemé et dilacéré autour d'amas s'organisant en particules denses. 13 600 x.

FIG. 7. — Vue partielle d'une cellule montrant à un grossissement un peu élevé un amas de particules de forme irrégulière résultant de l'infection herpétique. La membrane nucléaire est à gauche. 27 250 x.

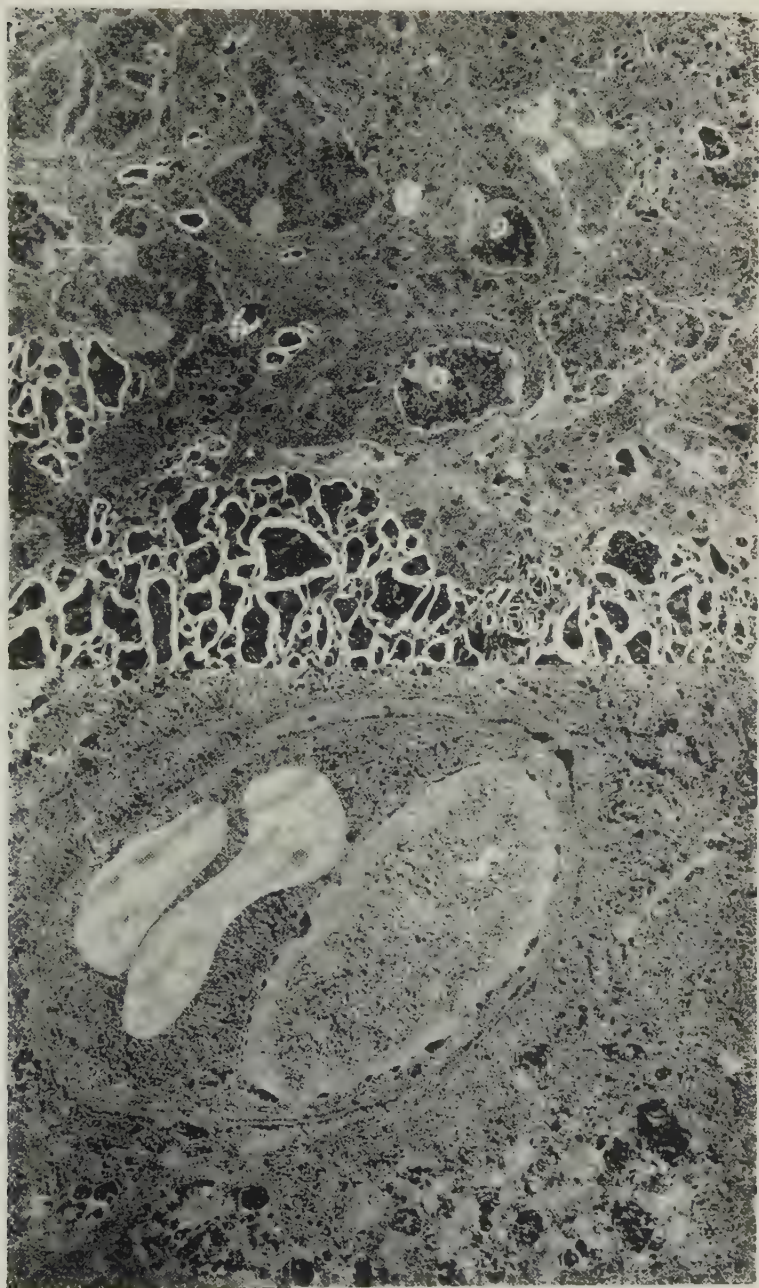


FIG. 1.

FIG. 2.

PLANCHE I.

MASSON ET C^{ie}. ÉDITEURS



PLANCHE II (FIG. 3 A.)

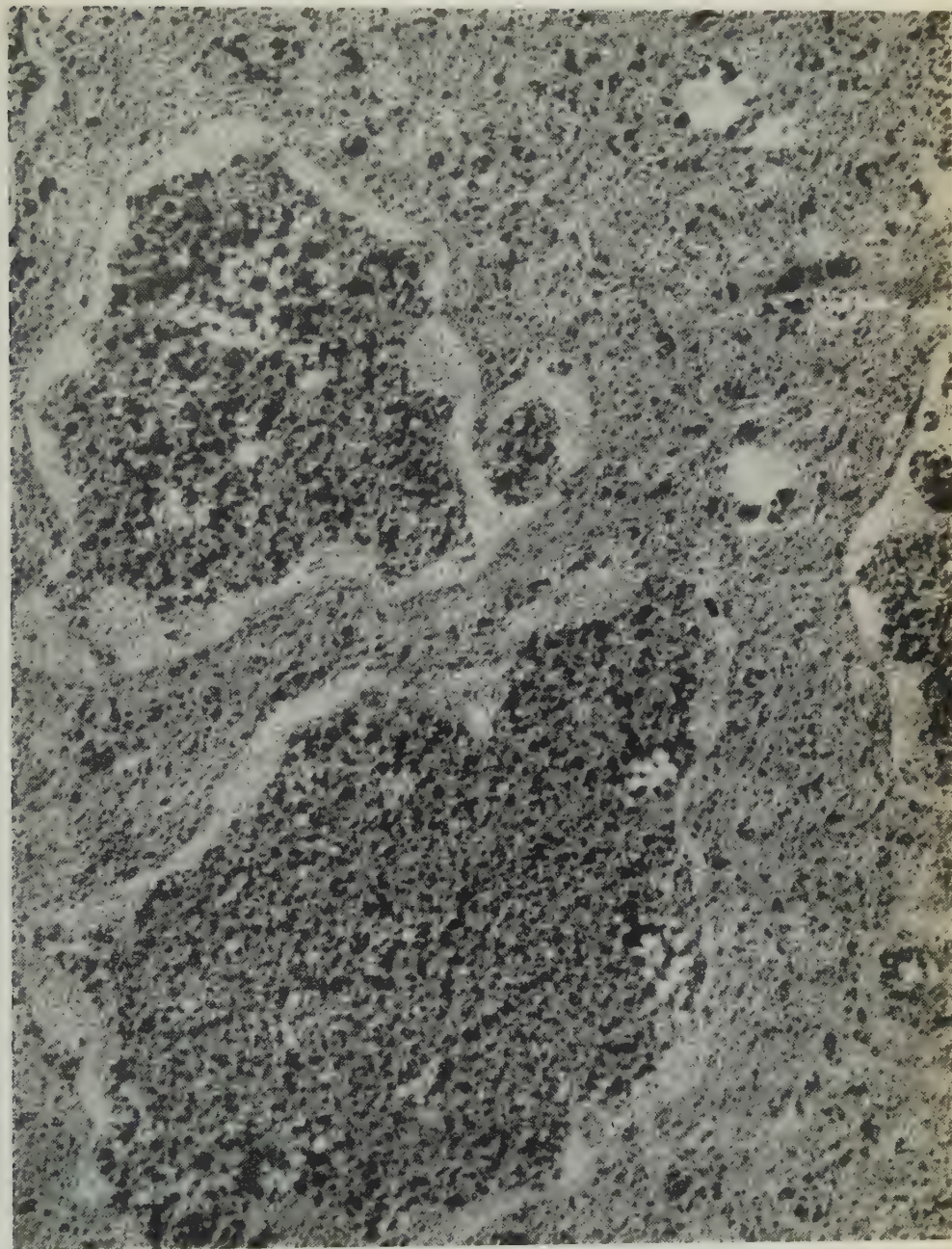


PLANCHE III (FIG 3 B).



PLANCHE IV.

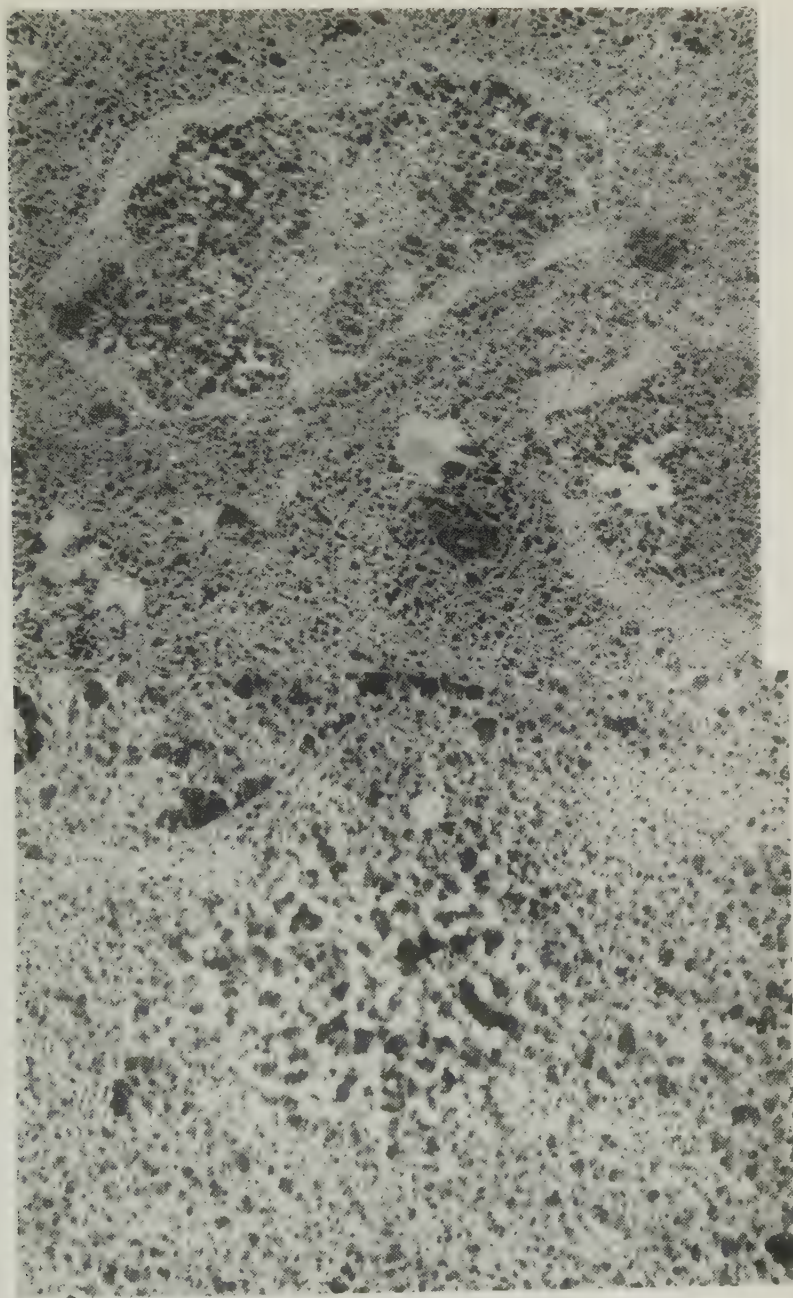


FIG. 6.

FIG. 7.

PLANCHE V.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

l'infundibulum. On peut voir plusieurs d'entre elles à la limite de la substance blanche et de la substance grise sur la figure 1 prise à un faible grossissement. Dans les figures 3 A et 3 B, une partie de ces mêmes groupes cellulaires est montrée à des grossissements plus élevés. Les noyaux de ces cellules ont des contours irréguliers mais néanmoins reconnaissables. Les limites cytoplasmiques qui permettent de définir normalement la ligne de séparation de deux cellules peuvent cependant rarement être distinguées. L'aspect caractéristique de la margination de la chromatine est constitué par l'épaississement d'un réticulum à grains fins réparti le long de la membrane nucléaire, soit en couche continue, soit en masses plus ou moins séparées. Ce réticulum présente à peu près la même texture que les nucléoles et montre souvent avec ces derniers, une continuité structurale. Quoique la dispersion chromatinienne marginale ait été décrite comme une conséquence précoce de l'infection herpétique, ce qui paraît le cas pour les neurones, elle n'est pas en elle-même caractéristique de la maladie, car certaines des cellules gliales de la substance grise, de même que les leucocytes, présentent des masses de chromatine disposées au pourtour des noyaux (fig. 2). Dans les cellules normales, la plus grande partie de la substance nucléaire forme un réseau lâche et d'aspect homogène contrastant avec la condensation marginale des cellules atteintes. Ce fait est bien visible sur la figure 4 dans laquelle on voit une cellule qui présente les premiers signes visibles de l'infection herpétique identifiables sous forme de particules denses aux électrons ayant la taille que l'on peut attribuer à l'unité virale.

A un stade plus avancé de l'affection, on observe des amas en grappe de ces mêmes particules dans le réseau nucléaire. Parfois, elles sont localisées au centre du noyau, dans d'autres cas, elles sont adhérentes à la chromatine marginale (fig. 5 et 6). Au voisinage de ces groupes de particules, le réticulum nucléaire est toujours lâche et dilacéré. Mais la signification exacte que l'on peut en fin de compte attacher à cette altération doit dépendre pour une large part du fait de l'existence réelle ou non de ce réticulum dans la cellule vivante.

Nos photographies ne permettent pas de déterminer exactement comment se développent ces amas, mais la continuité du réticulum, excepté au voisinage immédiat des amas de particules du virus, montre qu'il est probable que ces dernières ne résultent pas de l'agglomération de particules préformées qui se seraient agrégées après la désintégration du nucléoplasme.

L'interprétation précise de ce que l'on peut voir dans les cellules infectées par le virus herpétique est, en outre, rendue plus difficile du fait que l'on n'a jamais obtenu ni photographie de préparations purifiées de corps élémentaires du virus herpé-

tique, ce qui aurait permis d'établir l'identité de ce dernier avec les particules photographiées. Il est cependant naturel d'identifier avec le virus ces particules en voie de développement car elles sont situées dans les limites de taille prévues par la filtration et les autres méthodes de détermination. Mais il est évident que nous n'avons pas jusqu'ici de preuves de cette identité.

La formation d'autres amas typiques de particules est figurée à un grossissement un peu plus élevé sur les figures 7 et 9. Sur la figure 8, le détail d'un amas est reproduit à un grossissement encore plus fort. Ces diverses photographies n'apportent aucune preuve que les particules résulteraient de la stimulation de l'activité métabolique du noyau à la suite de l'infection. De même, il n'y a pas d'indice qu'elles soient issues d'une particule initiale ayant subi une division et une croissance organisée comme celle qui caractérise la prolifération des microorganismes.

Sur nos photographies, les particules de forme irrégulière apparaissent souvent comme des amas de plus petites particules. Comme il est évident que le matériel nucléaire se raréfie au fur et à mesure de l'infection, il n'est pas impossible que cette apparente structure soit produite par de minuscules particules normalement incluses dans le réticulum nucléaire, mais libérées à la suite de la désintégration du nucléoplasme du fait de l'infection. Si le réticulum protoplasmique que l'on voit toujours sur les coupes de matériel fixé à l'acide osmique n'est pas un artéfact, les grandes particules pourraient résulter de l'accumulation d'un tel matériel dans les mailles du réseau.

A un moment qui semble bien correspondre à un stade plus avancé de l'infection, les particules irrégulières des précédentes photographies semblent être remplacées par des particules d'une forme plus régulièrement arrondie et d'un diamètre plus uniforme (fig. 10 à 13). On peut naturellement supposer que ces dernières sont issues des particules irrégulières et qu'elles représentent une condensation plus avancée de celles-ci à un stade tardif de la production du virus néoformé.

Ces amas de particules en voie de développement sont ce qui correspond le mieux aux corps d'inclusion visibles au microscope optique. Nous n'avons pas, sur nos préparations au microscope électronique, retrouvé les très grandes inclusions remplissant la majorité du noyau qui caractérisent au microscope optique le stade final de l'inclusion. Il est possible que celles-ci soient des artéfacts causés par l'action brutale des fixateurs employés en microscopie classique sur les noyaux en cours de désintégration.

Bien que, dans les tissus que nous avons examinés, l'infection herpétique soit le plus souvent observée dans les cellules à chromatine marginée, elle n'est cependant pas limitée à ces cellules. A un stade plus tardif de l'infection, on observe des amas de

corpuscules en voie de développement, non seulement dans les noyaux des neurones (fig. 14), mais encore dans leur cytoplasme, ou dans celui des cellules gliales (fig. 15). Les particules de forme irrégulière présentent habituellement une structure interne pleine et homogène, même lorsqu'on arrive à la limite de résolution des plus fines structures. Cela n'est pas toujours vrai des plus petites particules d'une taille plus uniforme qui présentent souvent une dépression centrale ou un aspect annulaire (fig. 11 et 13). Ces formes en anneaux donnent l'impression de résulter de la section, lors de l'exécution de la coupe, de particules sphériques dont la partie centrale est incomplètement remplie. Les dépressions centrales peuvent aussi provenir d'un affaissement partiel au cours de la dessiccation.

Si le réticulum nucléaire a une existence réelle, tout ce que nous avons observé est compatible avec l'idée : 1° d'une part, que les particules ayant l'aspect du virus sont des gouttelettes d'un gel fortement hydraté formé dans les interstices du réseau ; 2° d'autre part, que ces particules ont acquis une membrane limitante (si elles ne la possèdent pas déjà) sous l'effet de la coagulation due au fixateur ; 3° enfin qu'elles ont été ensuite partiellement vidées par la déshydratation qui en a fait un corps creux.

Les particules que nous avons montrées ici sont sans aucun doute de la même nature que celles qui ont déjà été décrites sur les membranes chorio-allantoïdes [2] et en culture de tissus [4] infectées par le virus. Sur plusieurs centaines de coupes examinées, nous n'avons jamais vu d'autres particules présentant les dimensions que l'on peut attendre du virus. Il est probable que les formes annulaires observées sur nos préparations peuvent être identifiées avec les corps à double membrane qui ont été vus dans les coupes ultrafines des membranes chorio-allantoïdes [2]. Toutefois, il faut remarquer que dans les tissus que nous avons examinés, ces anneaux sont intranucléaires et que nos résultats n'apportent pas jusqu'ici de confirmation à l'hypothèse selon laquelle la formation de ces particules, commencée dans le noyau, se poursuivrait dans le protoplasme. Nous n'avons pas vu de différences essentielles de forme ni de taille entre les particules que l'on trouve dans le noyau et celles que l'on rencontre dans le protoplasme.

Il ne serait pas difficile d'élaborer à l'aide de nos micrographies électroniques une hypothèse expliquant dans le détail la nature du virus herpétique et décrivant la façon dont ces particules prennent naissance dans les cellules infectées. Il y a, cependant, encore beaucoup d'observations fructueuses à faire sur les tissus infectés avec le virus herpétique, et il nous semble pour l'instant plus sage de remettre à plus tard les spéculations

qui pourront alors porter sur des résultats tirés de l'ensemble des expériences en cours.

SUMMARY.

An electron microscopic study has been made of the brain tissue of rabbits, mice, and suckling mice infected with the virus of herpes simplex. At an early stage, irregular electron optically dense particles are visible within the fine network of the marginated nuclei of certain cells. These particles become more numerous as the infection proceeds and seem finally to transform

LÉGENDES DES PLANCHES

PLANCHE VI

FIG. 8. — Grappe de particules de formes irrégulières à un grossissement encore plus élevé. Leur fine structure et la désorganisation du réseau nucléaire accompagnant leur formation sont nettement visibles. 45 000 x.

PLANCHE VII

FIG. 9. — Vue partielle du noyau d'une cellule à un stade plus avancé de l'infection. De la chromatine à texture fine est visible au centre et à la périphérie. Des masses de corpuscules denses et d'anneaux d'une taille identique distribuées dans un réseau nucléaire en partie désintégré répondant à l'infection. Les anneaux sont plus facilement visibles au centre et à gauche, et en bas et à droite. 28 500 x.

FIG. 10. — Corpuscules massifs et corpuscules annulaires distribués parmi les résidus du réticulum d'un noyau infecté. 28 400 x.

PLANCHE VIII

FIG. 11. — Grappes de particules plus uniformes, dont plusieurs ont des centres vides, trouvées à un stade plus tardif de l'infection. La désintégration du réseau nucléaire est très avancée. 13 000 x.

FIG. 12. — Portion du noyau d'une cellule infectée montrant à droite du nucléole central un amas de particules annulaires. Au-dessus de celles-ci, un groupe de particules irrégulières en voie de développement. 24 000 x.

PLANCHE IX

FIG. 13. — Corpuscules de taille uniforme dans un autre noyau en voie de désintégration. 23 100 x.

PLANCHE X

FIG. 14. — Noyau d'un neurone infecté contenant plusieurs amas de particules irrégulières au début de leur développement. 9 900 x.

FIG. 15. — Amas de particules en voie de développement dans le cytoplasme d'une cellule infectée qui est probablement un neurone. 10 800 x.

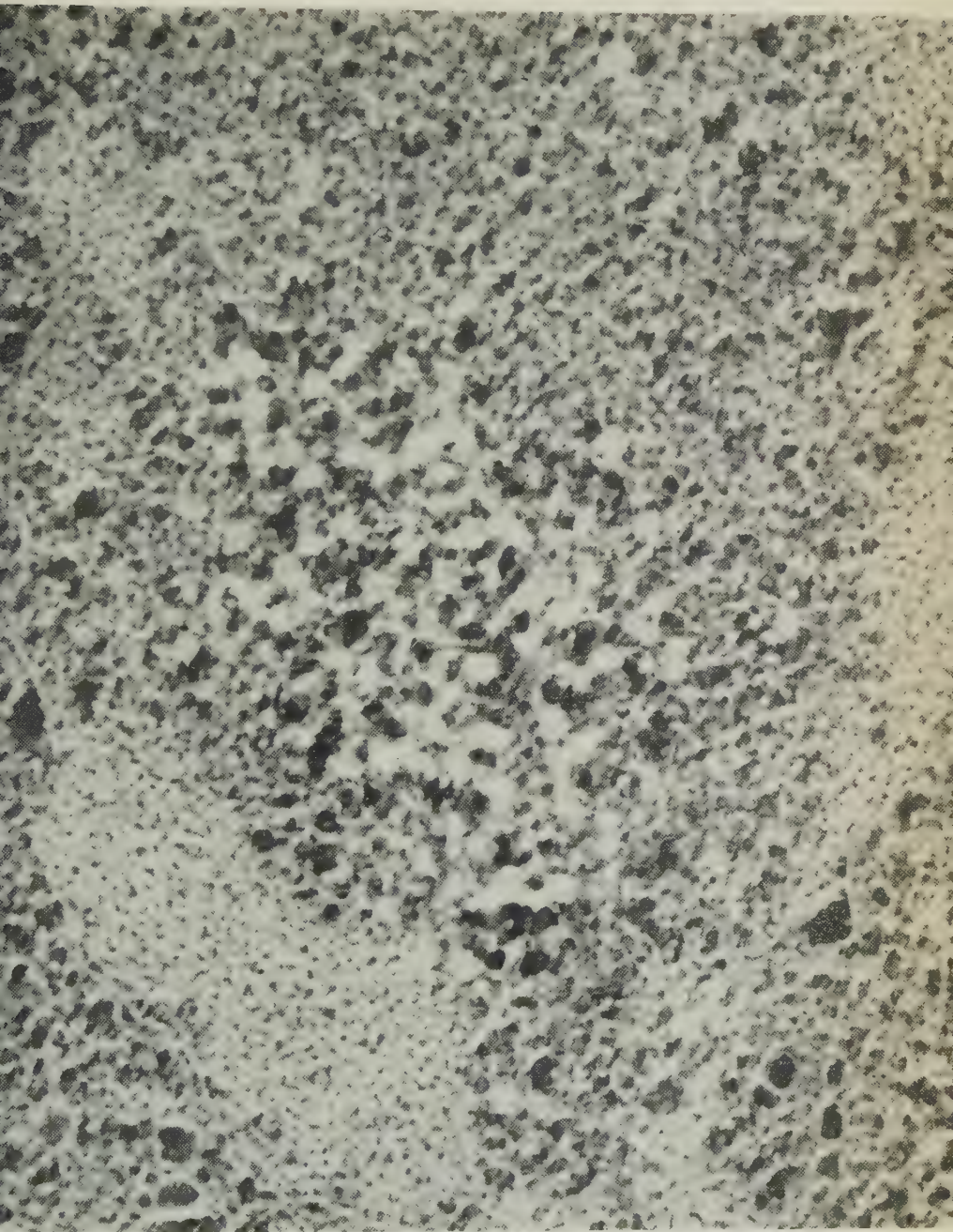


PLANCHE VI (FIG. 8).

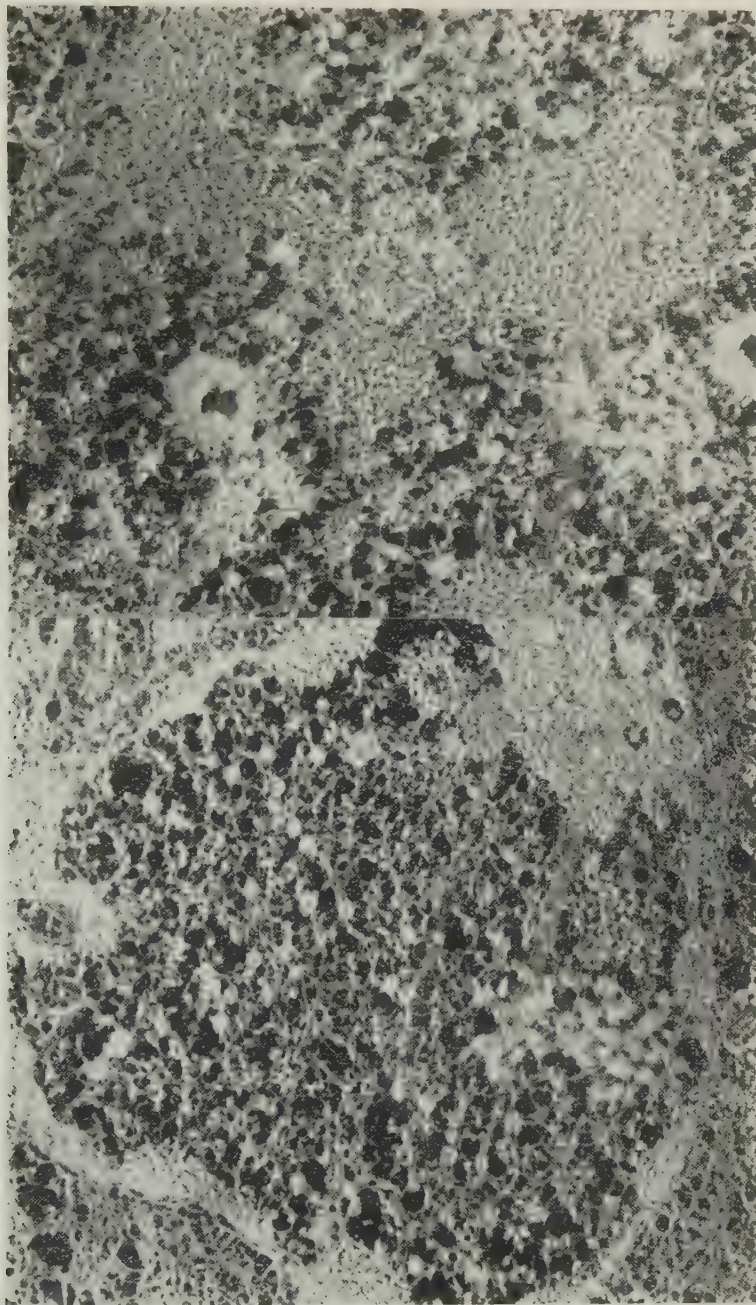


FIG. 9.

FIG. 10.

PLANCHE VII.

MASSON ET C^{ie}. ÉDITEURS

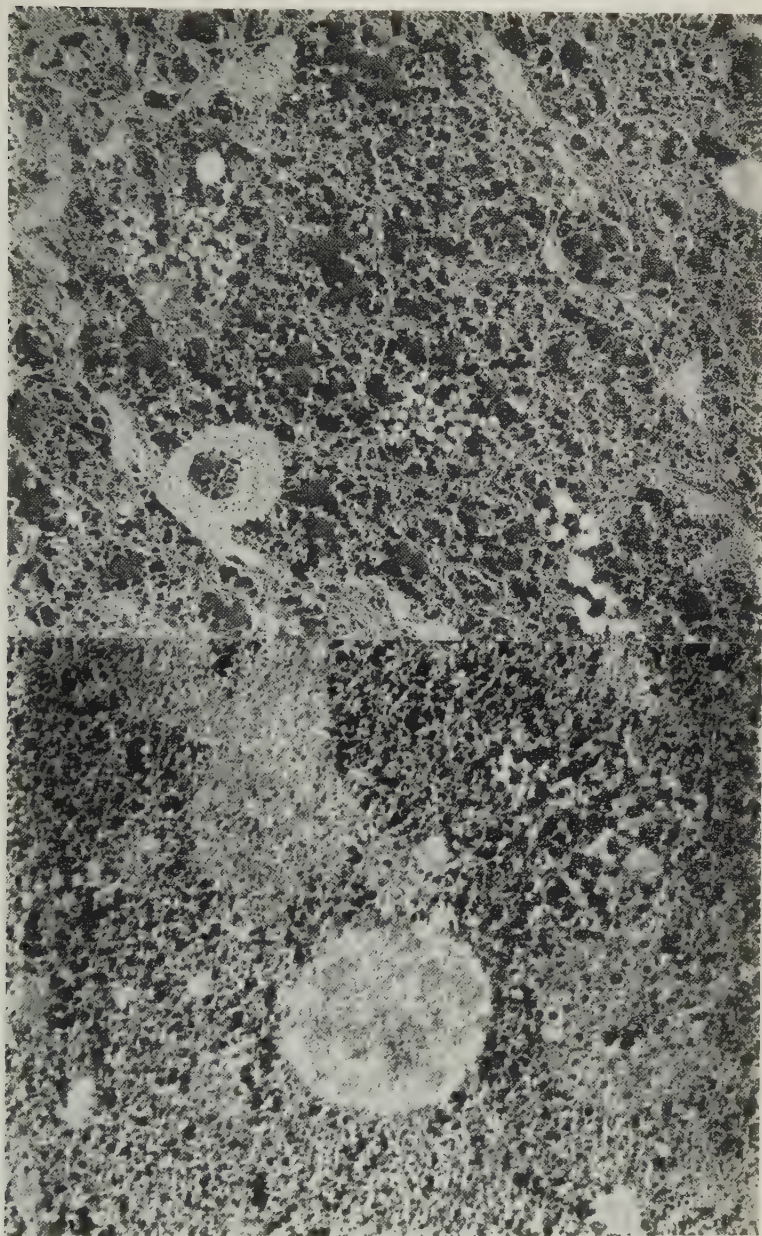


FIG. 11.

FIG. 12.

PLANCHE VIII.

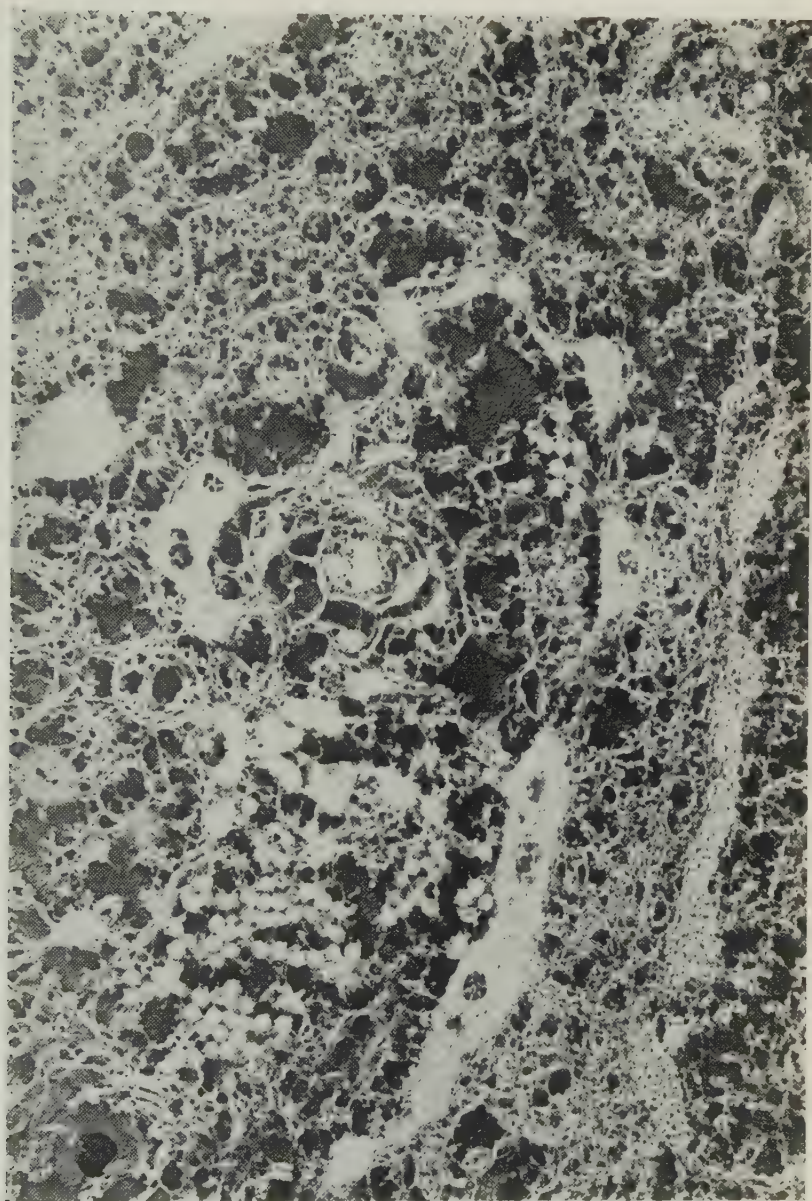


PLANCHE IX (FIG. 13).

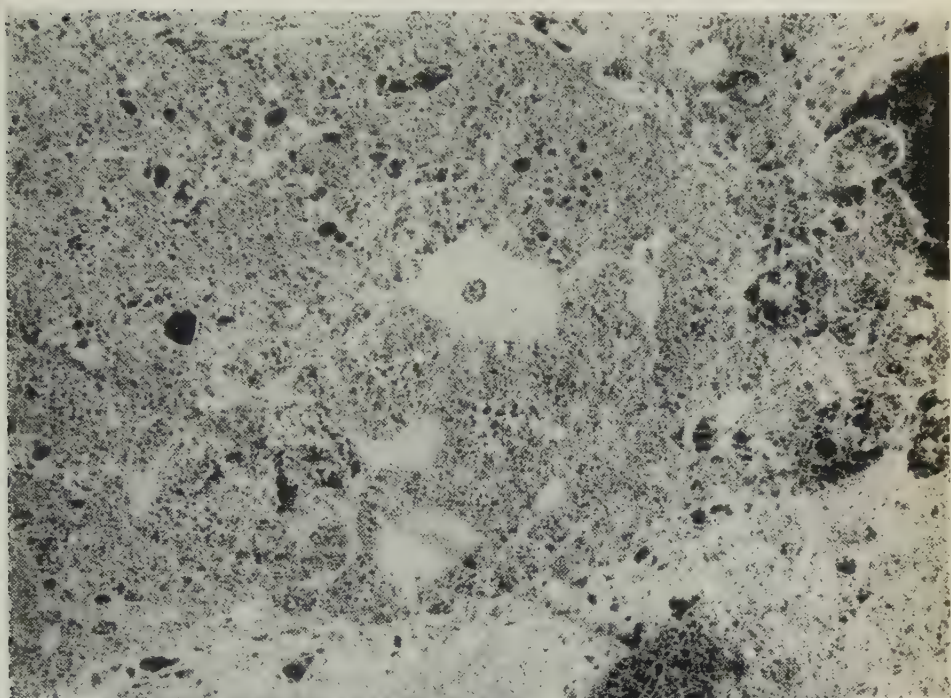


FIG.

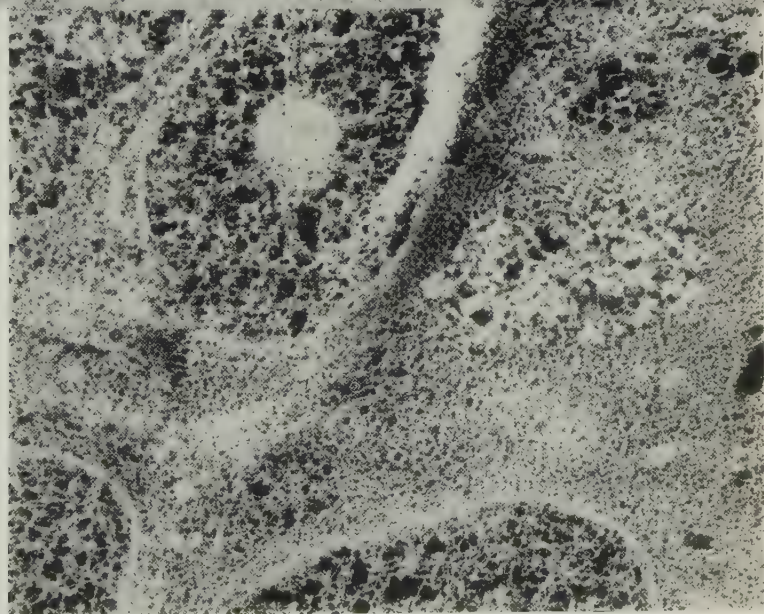


FIG. 15.

PLANCHE X.

MASSON ET C¹⁰, ÉDITEURS

into slightly smaller, more uniform spherical particles which presumably are the mature elementary particles of virus. Virus-like particles have been seen in the cytoplasm of cells only in terminal stages when their presence there would be the result of nuclear rupture. Some of the marginated cells within which these changes occur so closely resemble infiltrating leucocytes as to suggest that they, as well as nerve cells proper, may be diseased.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. REISSIG et J. L. MELNICK. *J. exp. Med.*, 1955, **101**, 341.
- [2] C. MORGAN, S. A. ELLISON, H. M. ROSE et D. H. MOORE. *J. exp. Med.*, 1954, **100**, 195.
- [3] B. LIPSCHÜTZ. *Arch. Derm. Syph. (Berlin)*, 1921, **136**, 428.
- [4] C. LEVADITI. *L'herpès et le zona*, Paris, Masson, 1926, 177-209.
- [5] O. CROISSANT, P. LÉPINE et R. W. G. WYCKOFF. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 183.
- [6] E. V. COWDRY et F. M. NICHOLSON. *J. exp. Med.*, 1923, **38**, 695.

IDENTIFICATION EN FRANCE DU VIRUS DE LA VARIOLE DU CANARI OU VIRUS DE KIKUTH

par H. JACOTOT, A. VALÉE et L. REINIÉ (*).

(Institut Pasteur,
Service de Microbiologie animale et Service des Virus)

La variole du canari a été observée et signalée sous la désignation d'*épithélioma contagieux du canari* par Lahaye en 1930 [1] et par Tagliavini en 1931 [2], mais ce sont Kikuth et Gollub qui, en 1932, à l'occasion de recherches sur le paludisme des oiseaux, l'ont définitivement caractérisée et en ont isolé l'agent causal communément appelé, depuis, virus de Kikuth [3]. L'année suivante Burnet confirmait l'appartenance du virus de Kikuth au groupe des virus varioliques [4].

Aucun cas de variole du canari n'a été signalé et, vraisemblablement, reconnu en France jusqu'à présent.

Au mois d'août 1954 notre attention était attirée sur un élevage de canaris de Villenoy, en Seine-et-Marne, où, en six semaines, 40 oiseaux sur 86 avaient succombé. Aucune précision n'était donnée sur l'évolution des troubles, mais on signalait que la maladie était apparue trois semaines après l'introduction d'un canari acheté à un oiseleur ambulant.

Un cadavre nous fut remis dont l'autopsie révéla une splénomégalie caractérisée et des lésions de pneumonie bilatérale. Les ensemencements restèrent négatifs, à l'exception de ceux du parenchyme pulmonaire qui donnèrent une culture de *Mucor*.

On inocule des œufs embryonnés par dépôt, sur la chorio-allantoïde, d'une suspension de rate ; il se forme sur la membrane des lésions massives ayant l'apparence des lésions varioliques et présentant sur les coupes des inclusions cytoplasmiques comparables aux corpuscules de Bollinger. On pense au virus de Kikuth.

IDENTIFICATION EXPÉRIMENTALE.

I. INOCULATION AU CANARI. — Douze canaris ont été employés aux essais successifs d'inoculation ; les inoculations ont été faites

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 octobre 1955.

par voies musculaire (trois fois), péritonéale (trois fois) et cutanée, par friction après arrachement des plumes à la face externe de la patte ou à la surface du thorax (six fois). Comme matériel virulent on a employé des suspensions de chorio-allantoïde, de rate, de poumons, une dilution de liquide phlycténulaire. La maladie a entraîné la mort dans 10 cas ; elle a été suivie de guérison dans 2 cas (après application cutanée). Les manifestations objectives et les constatations nécropsiques ont été comparables, d'une manière générale, à celles qui ont été rapportées par les auteurs précités. Voici à titre d'exemple les relevés condensés de deux des cas que nous avons étudiés.

1° Canari inoculé le 30 octobre 1954 par injection intrapérito-néale d'une suspension de chorio-allantoïde. Le 6 novembre

TABLEAU I.

Canaris	Inoculation	Matériel Virulent	Terminaison
G D	Intrapéritonéale	Membrane chorio-allantoïdienne de 1er passage.	Mort après 9 jours
223	"	"	Mort après 10 jours
191	"	"	Mort après 11 jours
B M	Intramusculaire	Membrane chorio-allantoïdienne de 2ème passage	Mort après 12 jours
V	"	Rate et poumon de 1er passage	Mort après 9 jours
J C	Intramusculaire et sous-cutanée	Rate de 1er passage	Mort après 6 jours
V D	Friction cutanée	Membrane chorio-allantoïdienne de 1er passage	Guérison après 3 semaines
V Q	"	Phlyctème de 1er passage	Mort après 23 jours
B V	"	Membrane chorio-allantoïdienne de 1er passage	Mort après 20 jours
P V	"	Membrane chorio-allantoïdienne de 4ème passage	Guérison après 2 semaines
G	"	"	Mort après 11 jours
L Q	"	"	Mort après 2 jours

l'oiseau accuse une sorte de tristesse ; il a les plumes ébouriffées ; le 10 la tête est enfouie sous l'aile, la respiration s'accélère et la mort survient. A l'autopsie, on note : sérosité abdominale abondante ; engouement pulmonaire.

2° Canari inoculé le 9 novembre 1954 par friction de la patte avec un écouvillon imbibé d'une suspension de phlyctènes. Le 12 la région est infiltrée ; le 16 la surface de la tuméfaction est de couleur jaunâtre ; le 23 elle est escarrifiée ; le 29 la tuméfaction est beaucoup plus importante ; le 30 les plumes sont ébouriffées ; le 2 décembre la dyspnée est intense, l'oiseau meurt. A l'autopsie, on note : œdème sous-cutané abondant et myosite dégénérative dans la région inoculée ; nombreuses vésicules jaunâtres sur tout le corps ; deux croûtelles aux commissures du bec ; pneumonie bilatérale intéressant notamment les deux tiers du poumon droit.

II. ESSAIS DE TRANSMISSION AU PIGEON. — Huit pigeons de race commune ont été inoculés, qui tous se sont montrés réceptifs. Le virus a été inoculé par friction de la face externe de la patte et de la surface du thorax après arrachement des plumes ; une réaction inflammatoire plus ou moins vive se développait en ces régions, l'évolution totale, vers la guérison toujours, s'effectuant en deux à trois semaines.

Exemple : Pigeon inoculé le 17 décembre 1954 avec une suspension de membrane chorio-allantoïdienne de quatrième passage. Le 20 la région est infiltrée ; le 23 un plastron de couleur rose, épais de 0,5 cm, recouvre les pectoraux ; il est bordé par une zone œdématisée de teinte rose jaunâtre ; sur la patte, on compte 18 bulbes plumeux tuméfiés, rose vif. On sacrifie l'oiseau. La lésion cutanée du thorax est prélevée et un fragment est broyé ; on fait une suspension pour inoculer trois autres pigeons selon le même protocole. Ils se comportent comme le précédent.

III. ESSAIS DE TRANSMISSION AU COQ. — Nous avons inoculé 6 coqs de race Leghorn par friction de la patte après arrachement des plumes ; tous ont répondu par une inflammation caractérisée des bulbes plumeux ; cette inflammation, d'ailleurs bénigne, évoluait en douze à quinze jours. L'examen histologique d'un fragment de peau prélevé six jours après l'inoculation a confirmé l'existence d'une réaction cellulaire à prédominance dermique, avec atteinte discrète, mais spécifique, localisée uniquement à l'épithélium d'insertion des plumes.

IV. ESSAI DE TRANSMISSION AU MOINEAU. — Nous avons inoculé un moineau par friction du thorax et de la patte ; il s'est formé au point d'inoculation sur le thorax une lésion cutanée caracté-

ristique, sorte de gomme oblongue, en relief régulier, de couleur jaune. Sur la patte une dizaine de bulbes plumeux ont été le siège d'une inflammation caractérisée. L'oiseau est mort dans le délai de dix jours ; il est possible que la captivité qui lui avait été brusquement imposée ait contribué à entraîner la mort.

V. PASSAGES PAR MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏDIENNE. — De nombreuses inoculations ont été pratiquées sur œufs de poule ayant dix, onze ou douze jours d'incubation, et toujours avec succès. Ont été employées à cet effet, comme matériel virulent, des suspensions de rate et de poumon de canari, de fragments de peau lésée de pigeon, de bulbes plumeux enflammés de coq ; les passages de membrane à membrane ont été réalisés sans difficulté. L'action du virus de Kikuth sur la chorio-allantoïde est tout à fait comparable à celle des virus du groupe des varioles ; la culture débute rapidement et progresse avec intensité ; le développement des lésions est toujours assez marqué quatre ou cinq jours après l'inoculation pour que l'on puisse recueillir un abondant matériel. Pour obtenir sur la membrane des granulations isolées, il faut inoculer des suspensions très diluées ; lorsqu'on ne procède pas ainsi la membrane est d'emblée le siège d'une infiltration massive où se discernent cependant des travées ou des amas de nodosités ; des zones de nécrose ne tardent pas à apparaître.

VI. INOCULATIONS CROISÉES AVEC LES VIRUS DES VARIOLES DU PIGEON ET DE LA POULE. — Les résultats de ces essais sont présentés dans les tableaux II et III. Toutes les inoculations ont été

TABLEAU II.

Pigeons	Inoculation			Réinoculation		
	Date	Matériel	Réaction	Date	Matériel	Réaction
<u>I - Inoculation première avec virus canari et réinoculation avec virus pigeon</u>						
G B	17.12.54	Suspension membrane	++	24.2.55	Suspension membrane	+++
P B	"	Suspension peau	+++	"	"	+++
<u>II - Inoculation première avec virus pigeon et réinoculation avec virus canari</u>						
J BI	24.5.55	Suspension membrane	+++	13.6.55	Suspension membrane	+++
J B	"	"	+++	"	"	++
Témoin				"	"	++

TABLEAU III

Coqs	Inoculation			Réinoculation		
	Date	Matériel	Réaction	Date	Matériel	Réaction
<u>I - Inoculation première avec virus canari et réinoculation avec virus pigeon</u>						
54	9.11.54	Suspension phlyctème	+++	23.12.54	Suspension membrane	+++
Témoin				"	"	+++
<u>II - Inoculation première avec virus canari et réinoculation avec virus poule</u>						
224	17.12.54	Suspension membrane	+++	24.2.55	Suspension membrane	+++ (mort)
29	"	"	++	"	"	+++ (mort)

faites par friction de la peau après arrachement des plumes ; les notations par croix (+) correspondent au maximum de la réaction, quelle qu'ait été l'évolution du processus. Il est évident que, dans aucun cas, il n'y a eu immunisation croisée. Toutefois nous avons observé que chez plusieurs pigeons qui avaient été inoculés préalablement avec le virus de la variole du pigeon, la réaction consécutive à l'inoculation ultérieure de virus de Kikuth apparaissait plus rapidement que chez les pigeons témoins. Cette précocité pourrait être l'expression d'une sorte de sensibilisation des oiseaux par le premier virus, indice d'une certaine parenté ; la constatation est à rapprocher du fait que, selon Burnet et Lush, le virus des gallinacés et celui des canaris sont, sérologiquement, très voisins.

VII. EXAMENS HISTOLOGIQUES. — Ils ont été pratiqués sur des pièces prélevées dans les diverses espèces précitées ; leurs résultats feront l'objet d'une relation spéciale ; nous nous bornerons à signaler ici que, contrairement aux assertions de certains auteurs, des corpuscules de Bollinger ont été décelés dans les lésions cutanées du coq et du pigeon ainsi que dans la membrane chorio-allantoïdienne.

RÉSUMÉ.

La présence du virus de Kikuth a été établie en Seine-et-Marne dans un élevage de canaris dont près de la moitié étaient morts en quelques semaines. Ainsi que l'expérimentation l'a montré, la souche de ce virus isolée là est pathogène pour le moineau, pour

la poule et pour le pigeon, mais, chez ces deux dernières espèces, l'inoculation virulente ne détermine que des accidents locaux spontanément curables. Ce virus n'immunise pas le pigeon contre le virus de la variole du pigeon et celui-ci n'immunise pas le pigeon contre le premier. Il n'immunise la poule, ni contre le virus de la variole de la poule, ni contre le virus de la variole du pigeon.

SUMMARY.

The presence of the virus of Kikuth (canary-pox) has been established in a canary aviary, of which half the birds were dead within a few weeks. It has been shown experimentally, that the strain of virus isolated is pathogenic for the sparrow, fowl, and for the pigeon, but in the two latter species infection is local and spontaneously curable. This virus does not immunize the pigeon against pigeon-pox and conversely pigeon-pox does not confer immunity in the pigeon against canary-pox. Similarly there is no immunity produced by canary-pox in fowls against fowl-pox nor against pigeon-pox.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LAHAYE. *Ann. Méd. Vétér.*, 1930, **75**, 515.
- [2] TAGLIAVINI. *Profilassi*, 1931, **4**, 8.
- [3] KIKUTH et GOLLUB. *Centralbl. Bak.*, 1932, **126**, 314.
- [4] BURNET. *J. Path. Bact.*, 1933, **37**, 107.

L'ACTION DE L'ISONICOTHYDRAZONE DE LA MÉTASULFOBENZALDÉHYDE « 605 G » SUR LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE DU COBAYE.

II. — APRÈS INOCULATION DE BACILLES TUBERCULEUX STREPTOMYCINO-RÉSISTANTS

par A. LUTZ et M^{me} M. A. WITZ (*)

(Laboratoire départemental de Bactériologie, Strasbourg
[Directeur : D^r A. LUTZ])

Dans nos communications antérieures [1, 2] nous avons étudié l'action du sulfoniazide (605 G) sur diverses souches de bacilles tuberculeux *in vitro* et sur la tuberculose expérimentale de cobayes inoculés avec des bacilles streptomycino-sensibles. Nous avons pensé qu'il serait intéressant de rapporter ici les résultats de notre étude sur des cobayes inoculés avec une souche de bacilles streptomycino-résistants.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.

Cent trente-cinq cobayes mâles d'un poids de 500 g sélectionnés ont été inoculés par voie sous-cutanée dans la région présternale avec 0,5 cm³ d'une dilution au 1/100 d'une culture de dix jours en Dubos d'une souche de bacilles tuberculeux streptomycino-résistants isolée de crachats d'un malade ayant présenté une tuberculose excavée. Cette souche nécessite pour son inhibition : 0,4 µg/ml de sulfoniazide et 200 µg/ml de dihydrostreptomycine.

La résistance de cette souche à la dihydrostreptomycine a été vérifiée *in vivo*. Une expérience préliminaire a montré que cet antibiotique, à la dose de 8 mg/kg/jour, ne permettait pas d'enrayer la tuberculose expérimentale des cobayes inoculés selon le mode précité. Les animaux survivant au quatre-vingt-deuxième jour (60 p. 100), soit après soixante jours de traitement, présentaient une tuberculose généralisée.

Au trentième jours, 8 cobayes ont été sacrifiés pour noter l'état macroscopique des lésions pré-traitement. Les 108 cobayes restant

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 octobre 1955.

ont été répartis en sept séries, dont une série témoin. Six séries ont été traitées de la façon suivante :

Série I : Sulfoniazide, 5 mg/kg *per os* une fois par jour.

Série II : Sulfoniazide, 8 mg/kg *per os* une fois par jour.

Série III : Sulfoniazide, 4,5 mg/kg sous-cutané trois fois par semaine.

Série IV : Sulfoniazide, 5 mg/kg *per os* une fois par jour + sulfoniazide, 4,8 mg/kg sous-cutané trois fois par semaine.

Série V : Sulfoniazide, 9 mg/kg sous-cutané trois fois par semaine.

Série VI : Sulfoniazide, 5 mg/kg *per os* une fois par jour + sulfoniazide, 9 mg/kg sous-cutané trois fois par semaine.

Au quatre-vingt-douzième jour après le début de l'expérience, soit après soixante-deux jours de traitement, nous avons sacrifié tous les animaux vivants.

La figure 1 résume les lésions macroscopiques observées.

Voici comment on peut apprécier ces lésions d'après la notation de Feldman et Hinshaw (voir tableau I).

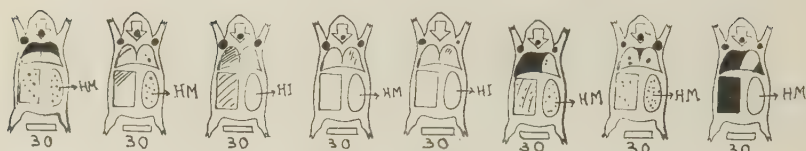
TABLEAU I.

Séries	Indice des lésions par organe de l'ensemble des animaux morts et sacrifiés					Mortalité	Indice lésionnel	
	Rate	Poumon	Foie	Chancre et ganglions axillaires	Ganglions trachéo-bronchiques		Total	des animaux sacrifiés
	35	30	25	10	10 (x)			
Témoins prétraitement	13	16,5	13,7	9,3	-	-	54,50	-
Témoins	28,75	22,5	20,25	9,25	-	55%	80,75	86,17
I	8,8	11,1	5,83	3	1,1	27,7%	29,80	28,48
II	4,16	4,16	2,08	1,25	-	25%	11,65	6,6
III	30	23,7	25	10	-	75%	88,70	95
IV	15,58	7,64	8,50	3	-	47%	34,72	14,4
VI	7,7	5	3,88	0,27	-	16,6%	16,85	14,6

Les lésions des ganglions trachéo-bronchiques ne sont notées qu'en l'absence des lésions du poumon.

Le schéma et le tableau lésionnel ci-joints mettent bien en évidence l'évolution des lésions chez les témoins par comparaison aux témoins « pré-traitement », tandis que les lésions des animaux des séries I, II, IV et VI évoluent vers la guérison.

TEMOINS PRETRAITEMENT



TEMOINS

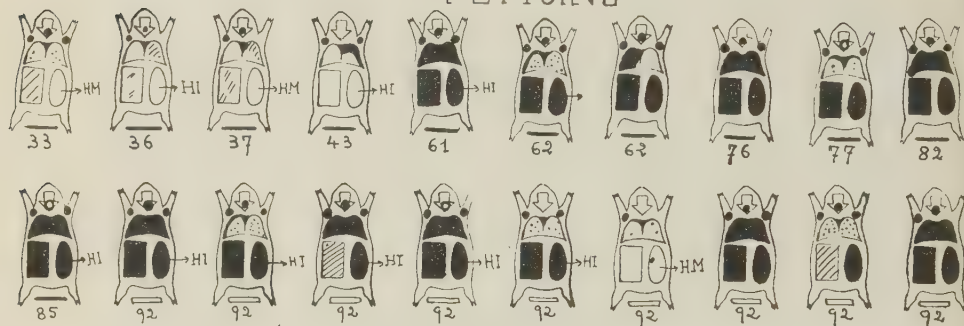
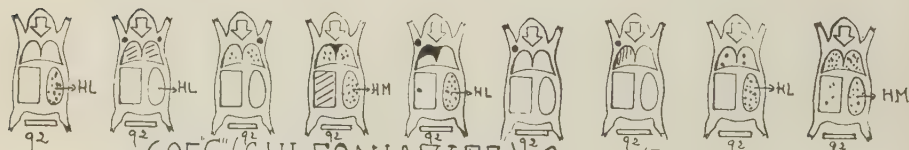
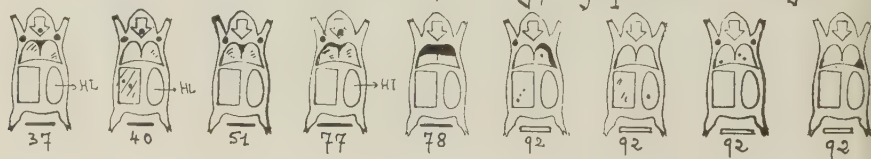
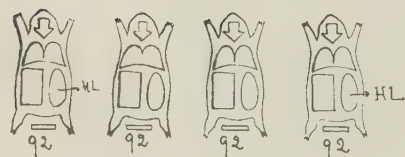
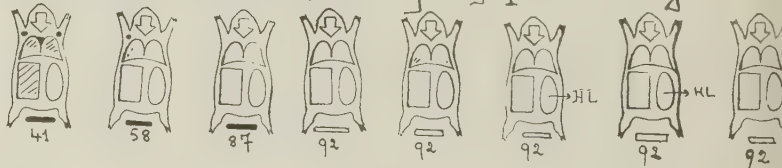
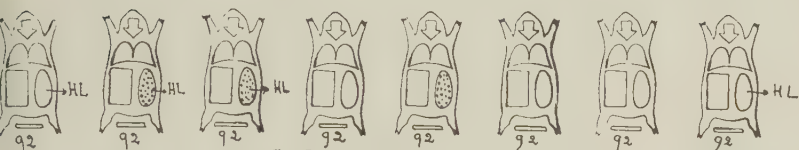
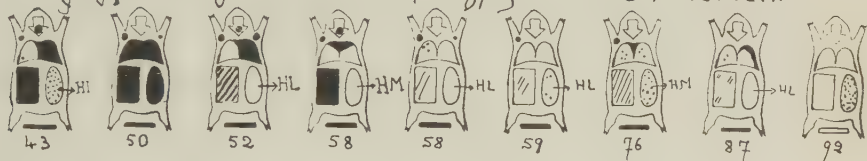
605G (SULFONIAZIDE) 5 mg/K₅-per os- 1 x jour605G (SULFONIAZIDE) 8 mg/K₅-per os- 1 x jour

FIG. 1.

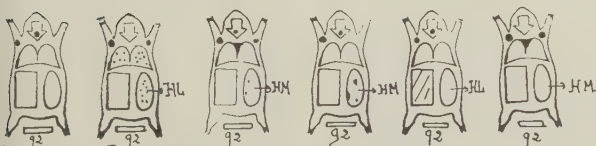
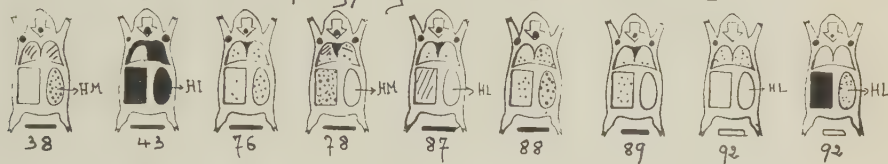
605 G 4,8 mg/Kg - s.c - 3 x semaine



605 G 5 mg/Kg per os 1x jour + 605 G 4,8 mg/Kg - s.c - 3 x semaine



605 G 9 mg/Kg - s.c - 3 x semaine



605 (G) 5 mg/Kg per os 1x jour + 605 G 9 mg/Kg - s.c - 3 x semaine

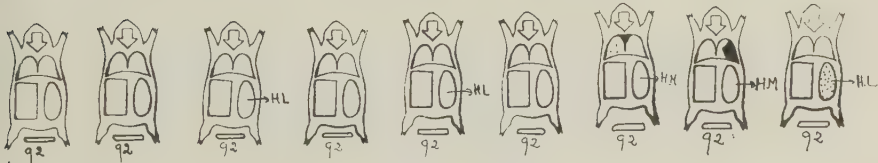
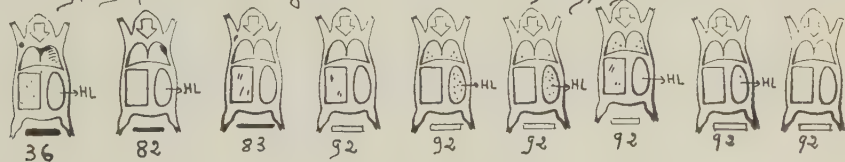


FIG. 1 (suite).

L'administration de 8 mg/kg par la bouche, dose relativement faible, a amené pour une grande partie des animaux la guérison (d'après les lésions macroscopiques) et nous a permis d'observer une régression spectaculaire des lésions ganglionnaires.

De l'association d'une dose de 605 G administrée par voie sous-cutanée, insuffisante par elle-même, à une quantité réduite de la substance *per os* résulte un effet curatif très accusé, montrant l'intérêt de la fraction de 605 G des sels neutres de streptomycine ou de dihydrostreptomycine avec le sulfoniazide dans le cas d'une infection à bacilles streptomycino-résistants, ce qui fera l'objet d'une autre étude.

Par ailleurs, l'examen des courbes pondérales des animaux des séries I, II, IV et VI montre un accroissement très net de leur poids et une parfaite tolérance du produit aux diverses doses.

L'examen des divers aspects histo-pathologiques des lésions fera l'objet d'un travail séparé.

RÉSUMÉ.

Ce travail met en évidence une action spectaculaire du sulfoniazide sur la tuberculose expérimentale du cobaye à bacilles streptomycino-résistants, confirmant ainsi nos résultats antérieurs.

SUMMARY.

This work reveals the spectacular action of sulphoniazide upon experimental tuberculosis in guinea pig produced by a streptomycin-resistant strain of bacillus, confirming previous results obtained by the authors.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. LUTZ et M^{me} A. WITZ. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 236.
- [2] A. LUTZ et M^{me} M. A. WITZ. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 327.

LA PRODUCTION EXPÉRIMENTALE DE MALFORMATIONS MAMMAIRES CHEZ LES FŒTUS DE SOURIS, PAR L'ACTION DES HORMONES SEXUELLES

PREMIÈRE PARTIE

par ALBERT RAYNAUD et Madame JEANNE RAYNAUD (*).

(*Institut Pasteur [Laboratoire de Sannois, Seine-et-Oise,
et Laboratoire Pasteur de l'Institut du Radium, Paris]*)

I. — Introduction.

L'étude des malformations mammaires « spontanées » a fait l'objet de nombreux travaux, chez la femme et chez divers mammifères ; des études d'anatomie et d'histopathologie leur ont été consacrées ; la tératologie s'est particulièrement intéressée aux malformations externes de l'appareil mammaire, aux anomalies de nombre et de position des mamelles et des mamelons. A côté des travaux originaux portant sur l'étude de ces malformations, on trouve dans la littérature les observations essentielles relatives à ces anomalies, groupées en chapitres spéciaux, dans les ouvrages consacrés au développement de la mamelle et dans la plupart des traités généraux d'histopathologie mammaire.

D'une façon générale, les diverses modifications que peut présenter la mamelle, peuvent être groupées en deux grandes catégories : d'une part, les lésions postnatales ; d'autre part, les malformations congénitales, prenant naissance chez l'embryon ou chez le fœtus, au cours de la morphogénèse des ébauches mammaires.

Les lésions postnatales de la mamelle, sont actuellement les mieux connues ; au cours des vingt dernières années, l'étude de la structure de la mamelle adulte et de ses modifications a pris une grande extension grâce à l'emploi expérimental des hormones sexuelles, des hormones hypophysaires et, plus récemment, des hormones thyroïdiennes ; toute une série de modifications fon-

(*) Manuscrit reçu le 4 octobre 1955.

tionnelles, de dystrophies mammaires adultes, résulte de déséquilibres hormonaux, ou de l'action anormalement intense ou insuffisante d'une hormone ; des facteurs hormonaux modifient profondément la structure histologique de la mamelle, ils peuvent même conduire à la production de formations kystiques ou adénomateuses (action d'extraits de liquide folliculaire chez la souris, N. Goormaghtigh et A. Amerlinck, 1930) ou intervenir dans la genèse de tumeurs cancéreuses (greffes ovariennes, W. S. Murray, 1927 ; injection de benzoate d'œstrone à la souris mâle, A. Lacassagne, 1932, etc.) ; nous ne pouvons insister davantage sur ces faits désormais classiques.

Les *malformations congénitales* de la mamelle constituent une grande famille de lésions, souvent qualifiées de « spontanées », se présentant sous des aspects variés ; et, si l'existence de certaines d'entre elles était depuis longtemps décelée, par contre, aucune d'elles n'avait été reproduite expérimentalement et nos connaissances sur leur étiologie étaient à peu près nulles.

D'une façon générale, les observations publiées jusqu'à présent (nous n'en citons ici [1-18] qu'un petit nombre) portaient presque exclusivement sur les anomalies du nombre et de la position des mamelles : variations en plus ou en moins du nombre des mamelles et des mamelons (amastie, athélie, polymastie, polythélie, etc.) ; elles se rapportaient surtout à l'appareil mammaire externe ; les descriptions d'une transformation d'une mamelle sont rares et se limitent presque toujours à des cas de micromastie et à des défauts des mamelons.

L'origine de ces anomalies spontanées résulte, très vraisemblablement, d'un trouble très précoce du développement ; l'explication classique de leur genèse considère que les anomalies *per defectum* résultent soit d'une absence de formation, soit d'une atrophie de la ligne mammaire, ou d'une partie de cette ligne, les malformations *per excessum* relevant, au contraire, d'une persistance anormale de segments de cette ligne.

Nos recherches ont montré, à partir de 1947, qu'il était possible d'obtenir, par l'action des hormones sexuelles, des malformations congénitales de la mamelle ; ces modifications expérimentales sont très variées, et elles présentent les caractères suivants :

D'une part, elles diffèrent de l'amastie et de la polymastie primaires spontanées : nous n'avons pas reproduit des anomalies aussi précoces car la période de nos interventions sur l'embryon est relativement plus tardive ; mais il est possible que dans certains cas, les hormones sexuelles injectées à la mère gravide puissent agir très précocement sur l'appareil mammaire des fœtus.

D'autre part, les suppressions d'ébauches mammaires que nous

avons expérimentalement obtenues réalisent une amastie secondaire, par suppression d'une ébauche préexistante ; ces effets, produits par l'action des hormones androgènes et des hormones œstrogènes, conduisent à une diminution du nombre des mamelles ; d'autre part, dans certains cas, il est possible que les œstrogènes conduisent à la formation de mamelles surnuméraires au voisinage de mamelles normales. Enfin, les hormones mâles ont la propriété de provoquer une condition d'athélie congénitale ;

Et surtout, nos expériences ont abouti à la production de véritables malformations des ébauches mammaires : s'opposant aux anomalies du nombre ou de la répartition des mamelles, elles atteignent, individuellement, une ou plusieurs glandes et montrent les diverses transformations qu'une glande est susceptible de subir dans sa structure sous l'effet de l'agent expérimental. Nous avons ainsi produit des lésions congénitales très variées dont un grand nombre non observées jusqu'ici ; les malformations du mamelon que nous avons obtenues reproduisent, par contre, nombre de lésions bien connues ; ces diverses malformations de la mamelle et du mamelon peuvent être produites à une époque assez tardive du développement, en intervenant au stade du bourgeon mammaire primaire.

D'autre part, les facteurs responsables de l'apparition de ces malformations congénitales étaient jusqu'à présent inconnus ; notre étude permet d'entrevoir la cause de ces lésions : l'action de substances chimiques du groupe des hormones sexuelles sur l'ébauche embryonnaire de la mamelle.

L'étude des mécanismes réalisateurs de ces malformations mammaires ouvre un nouveau chapitre de l'embryologie expérimentale.

Ces observations présentent, en outre, un intérêt médical : la plupart de ces malformations suppriment pratiquement toute possibilité d'allaitement, soit que la glande ait été totalement ou subtotalemtent arrêtée dans son développement, soit que les seules malformations du mamelon suppriment la possibilité de tétée ; en outre, la plupart de ces malformations fœtales doivent conduire soit à des lésions graves chez l'adulte, soit à des troubles de la croissance ou de la physiologie de la glande au cours de la vie post-natale ; on sait aussi que les malformations du mamelon sont presque toujours la cause, chez l'adulte, d'inflammations ou d'abcès pendant la lactation ; or, les malformations du mamelon sont très fréquentes chez les fœtus traités par les œstrogènes. Nous verrons enfin que les doses relativement faibles d'hormone œstrogène injectées à la souris gravide sont capables de provoquer des altérations légères, mais variées et nombreuses, des ébauches mammaires ; cette action nuancée pourrait expliquer beaucoup d'« insuffisances » mammaires.

Ces nouvelles données montrent que l'action des hormones sexuelles ne se limite pas à la glande adulte, mais qu'elle s'étend à la période prénatale ; et c'est sans doute pendant la période fœtale que l'action nocive de ces agents hormonaux sur la glande mammaire est la plus accentuée.

Nous allons rapporter maintenant l'essentiel de nos recherches relatives à l'action des hormones androgènes et des hormones œstrogènes sur le développement prénatal de la glande mammaire de la souris.

Etant donné la longueur de ce travail, il a été nécessaire de le diviser, pour sa publication, en deux parties ; la première comportera l'étude des modifications du développement de la mamelle fœtale, provoquées d'abord par les hormones androgènes injectées à la mère gravide, puis par les substances œstrogènes injectées directement au fœtus ; pour faciliter l'étude des malformations mammaires ainsi produites, nous ferons précéder ces deux chapitres d'un exposé des principales étapes du développement embryonnaire normal de la glande mammaire. La deuxième partie qui paraîtra dans le numéro suivant de ces *Annales* sera consacrée à la relation des effets, sur la mamelle fœtale, des hormones œstrogènes injectées à la souris gravide. La discussion générale des résultats sera placée à la fin de cette deuxième partie.

II. — Le développement embryonnaire normal de la glande mammaire de la souris.

Les ébauches mammaires de l'embryon de souris apparaissent à la fin du jour 10, ou au début du jour 11 de la vie intra-utérine, sous forme de petits épaississements discoïdaux de l'épiderme [49, 20] ; leur développement a été étudié par Turner et Gomez [49], et plus récemment par Balinsky [20-22] ; nous renvoyons le lecteur à ces travaux, nous contentant de donner ici quelques précisions tirées de nos recherches personnelles.

Au jour 13 de la vie fœtale, ces ébauches ont, en section, la morphologie représentée sur la figure 1 ; l'amas lenticulaire primitif s'est épaissi et a pris une forme hémisphérique ; au jour 14, il constitue un amas cellulaire à peu près sphérique, le bourgeon mammaire primitif (fig. 2), inséré par sa base dans l'épiderme, ou, un peu plus tardivement, attaché à l'épiderme par un col étroit ; jusqu'à ce stade, les ébauches mammaires se développent d'une manière semblable dans les deux sexes.

A partir de la deuxième moitié du jour 14 de la vie intra-utérine, l'histogénèse mammaire va suivre une voie différente suivant le sexe du fœtus :

Chez les fœtus de sexe femelle, les ébauches mammaires restent attachées à l'épiderme et se développent de la manière suivante.

Au stade de 14 jours 14 heures (fœtus de la lignée XXX, pesant de 175 à 200 mg), les ébauches ont encore la forme d'un bourgeon grossièrement sphérique dont la base est insérée dans l'épiderme ; vingt-quatre heures plus tard (stade de 15 jours 13 heures à 15 jours 17 heures, fœtus de la lignée XXX pesant de 300 à 350 mg), les ébauches mammaires présentent une structure différente ; elles sont maintenant (fig. 3) constituées de deux parties : une partie distale renflée, semblable au bourgeon mammaire du stade précédent ; cette partie renflée est reliée à l'épiderme par une tige (ou col) étroite, cylindrique, formée de cellules à cytoplasme clair (largement vacuolaire), identiques aux cellules de l'épiderme ; la longueur de cette tige atteint, par exemple, 75 à 85 μ et son diamètre 50 μ pour une ébauche de la 1^{re} paire inguinale ; le diamètre du bourgeon mammaire terminant cette tige est compris entre 75 et 100 μ ; l'étude de stades intermédiaires entre ce stade et le précédent montre que cette tige épidermique s'est formée par la prolifération des cellules épidermiques dans le voisinage de la base du bourgeon mammaire ; par ce processus, le bourgeon mammaire a été refoulé dans le mésenchyme sous-jacent. La formation de la tige épidermique est plus avancée au niveau des ébauches pectorales qu'au niveau des inguinales ; et la tige est plus développée au niveau de la 1^{re} paire pectorale qu'au niveau de la seconde, et plus développée au niveau de la seconde qu'au niveau de la troisième ; de même, elle est plus longue au niveau de la 1^{re} paire d'ébauches inguinales qu'au niveau de la deuxième.

Au stade suivant (16 jours 12 heures), la tige épidermique s'est allongée et le bourgeon mammaire est enfoncé dans le mésenchyme ; mais sur les sections médianes de la tige, on observe (fig. 4, pl. I) qu'une dépression s'est formée à la base de la tige et s'étend vers l'intérieur ; la tige commence donc, ainsi, à se fissurer, à s'ouvrir dans son axe ; le bourgeon mammaire est plus développé qu'au stade précédent ; ses cellules présentent des mitoses ; il est toujours situé à l'extrémité distale de la tige épidermique.

Vingt-quatre heures plus tard (fœtus âgés de 17 jours 13 heures, pesant de 650 à 750 mg de la lignée XXX), le col épidermique s'est complètement ouvert ; il est remplacé par une dépression de la peau et le bourgeon mammaire est maintenant inséré, par sa base, dans l'épiderme (fig. 5, pl. I) ; ce bourgeon est devenu très fortement basophile, ses cellules présentent des mitoses nombreuses ; il s'est maintenant allongé et transformé en un petit cordon cellulaire, le cordon mammaire primaire, atteignant 160 à 270 μ de longueur (première ébauche inguinale gauche de fœtus

femelles de la lignée XXX, âgés de 17 jours 13 heures, pesant de 680 à 730 mg.

Chez les fœtus femelles âgés de 18 jours et quelques heures, l'ébauche mammaire a pris la forme d'un cordon à peu près cylindrique, atteignant environ 350 à 400 μ de longueur (première ébauche de la 1^{re} paire inguinale d'un fœtus femelle de la lignée XXX, âgé de 18 jours 12 heures, pesant 923 mg) ; la base du cordon est insérée dans l'épiderme ; il s'enfonce profondément dans le mésenchyme sous-épidermique et il n'est pas ramifié. Au voisinage du terme (vers la fin du jour 18) de la vie fœtale, ce cordon se bifurque à une distance d'environ 300 μ de sa base et les deux branches ainsi formées commencent à se ramifier à leur tour ; la longueur de ces ébauches varie de 500 μ à 1 000 μ environ ; c'est à ce stade que débute la formation de l'invagination de la couche basale de l'épiderme, tout autour de la base du cordon mammaire ; cette formation, qui délimitera le mamelon, apparaît sur les sections médianes sous forme de deux petites pointes ; elle s'accroît ensuite et est déjà bien apparente chez le nouveau-né de sexe femelle (fig. 7, pl. I).

Chez les fœtus de sexe mâle, les ébauches mammaires inguinales et pectorales vont se détacher de l'épiderme à la fin du jour 14 ou au cours du jour 15 du développement (A. Raynaud, 1947 ; A. Raynaud et J. Raynaud, 1953) : chez les fœtus mâles pesant de 180 à 250 mg, une condensation mésenchymateuse se forme autour de la base du bourgeon mammaire ; cette base s'amincit, prend la forme d'une tige étroite ; la condensation mésenchymateuse est particulièrement épaisse autour de cette tige ; les cellules mésenchymateuses présentent des modifications nucléaires et, dans la tige du bourgeon mammaire, de nombreuses cellules entrent en pycnose ; cette tige s'amenuise et, au cours des vingt-quatre heures suivantes (jour 15 de la vie fœtale, fœtus pesant de 300 à 400 mg), la tige se rompt et le bourgeon mammaire s'isole dans le mésenchyme sous-épidermique [23, 24] (fig. 8, pl. II) ; là, il se développera progressivement en un petit cordon qui se ramifiera légèrement et acquerra, dans sa partie distale, une petite lumière, vers la fin de la vie fœtale ; mais ce petit élément glandulaire n'aura plus de communication avec l'extérieur. Ce processus de séparation des ébauches d'avec l'épiderme intéresse la plupart des ébauches mammaires des fœtus mâles ; cependant, certaines ébauches sont soumises au processus de destruction suivant.

Un certain nombre d'ébauches mammaires (la dernière paire d'ébauches et quelques ébauches pectorales, en général), vont être détruites et disparaîtront totalement (A. Raynaud, 1949 [25] ; A. Raynaud et J. Raynaud, 1953 [26]) : chez les fœtus mâles âgés de 14 jours 14 heures, pesant de 250 à 300 mg, un groupement

important de cellules mésenchymateuses enveloppe la totalité de chaque ébauche qui va être détruite ; ces cellules présentent des modifications de structure (turgescence nucléaire, margination de la chromatine) ; en même temps, le volume du bourgeon mammaire se réduit, ses cellules sont serrées les unes contre les autres et beaucoup d'entre elles entrent en pycnose ; le bourgeon s'amenuise ainsi progressivement (fig. 9, pl. II), et au cours des jours suivants (seizième et dix-septième jours de la vie fœtale ; fœtus pesant 300 à 600 mg), ses restes sont rejetés à l'extérieur par suite d'un soulèvement du derme sous-jacent.

Les cellules mésenchymateuses entourant ou enveloppant le bourgeon mammaire jouent donc, très probablement, un rôle important dans le processus de détachement ou de destruction des bourgeons mammaires des fœtus mâles ; les aspects cytologiques semblent indiquer que ces cellules exercent sur le bourgeon mammaire à la fois une action mécanique et une action chimique (production probable d'une substance cytotoxique qui, diffusant dans le bourgeon mammaire, provoque la nécrose de ses cellules).

Il a été établi que c'était le testicule fœtal qui, par sa sécrétion masculinisante, était la cause de ces différences sexuelles dans l'histogénèse des ébauches mammaires fœtales : après radio-destruction des testicules, les ébauches mammaires ne se détachent pas de l'épiderme et l'invagination épidermique délimitant le mamelon se constitue [27, 28].

D'autre part, la destruction des ovaires n'influence pas la morphogénèse de la glande mammaire des fœtus femelles ; ce développement fœtal de la mamelle semble donc s'effectuer d'une façon an hormonale ; il doit être régi par des facteurs autres que ceux qui stimulent le développement de la glande au cours de la vie post-natale ; d'ailleurs le développement de la glande mammaire s'effectue d'une façon comparable chez les fœtus mâles et femelles castrés précocement au moyen des rayons X (type neutre).

III. — Les anomalies du développement fœtal de la mamelle, provoquées par les hormones sexuelles.

C'est l'étude du développement embryonnaire normal de la glande mammaire qui a ouvert la voie à ces recherches : nous avons, en effet, montré (voir chapitre II), que chez la souris mâle normale l'ébauche mammaire présente un mode spécial de développement ; la castration des fœtus a montré que cette histogénèse spéciale relevait de l'action hormonale du testicule fœtal ; corrélativement nous avons été amenés à étudier l'action des hormones

androgènes sur les ébauches mammaires des fœtus femelles ; et cette étude nous a révélé que les androgènes avaient la capacité de masculiniser ou d'inhiber les ébauches mammaires des fœtus. Nous avons ensuite recherché si les hormones œstrogènes pouvaient aussi modifier la morphogénèse de la mamelle ; et cette étude nous a montré que les œstrogènes pouvaient produire une gamme très étendue de malformations mammaires.

Nous allons relater successivement les effets des hormones androgènes et des hormones œstrogènes sur le développement fœtal de la glande mammaire de la souris.

**A. — Action des hormones androgènes
sur le développement fœtal
de la glande mammaire de la souris femelle.**

On sait que chez le fœtus mâle de souris, les ébauches mammaires présentent un mode de développement particulier, dû à l'action du testicule fœtal.

Les hormones androgènes, agissant sur le fœtus femelle, impriment aux ébauches mammaires un mode de développement semblable à celui que le testicule provoque normalement chez le fœtus mâle ; les substances androgènes agissent à la fois sur le mamelon et sur la mamelle.

Action des androgènes sur l'aire mamelonnaire.

Rappelons tout d'abord que différents expérimentateurs, en particulier Greene, Burrill et Ivy chez le rat [29], ont noté que, chez les femelles qui avaient été soumises à l'action prénatale de l'hormone mâle, il ne se développait pas de mamelons ; mais ces auteurs n'ont pas effectué d'étude histologique de l'aire mammaire.

Chez la souris, l'un de nous avait également noté, en 1942 [30], l'absence de mamelons chez les femelles nées de mères ayant reçu des injections de propionate de testostérone pendant la gestation.

En 1949, l'examen de ce problème a été repris [25] en étudiant microscopiquement la structure de l'aire mammaire des souris femelles nouveau-nées provenant de mères ayant reçu des injections de propionate de testostérone au cours de la gestation : l'examen des sections histologiques montre que l'épiderme de l'aire mammaire s'étend d'une façon régulière et continue au-dessus de l'ébauche mammaire ; la couche basale de cet épiderme ne s'est pas invaginée autour de l'ébauche mammaire, comme elle le fait chez les femelles normales pour délimiter un mamelon.

Dans d'autres séries d'expériences [30, chapitre III], il a été

constaté que lorsque des doses élevées d'hormone mâle (10 à 25 mg de propionate de testostérone, par exemple) sont injectées simultanément avec une hormone œstrogène (5 à 15 mg de dipropionate d'œstradiol, par exemple), l'hormone mâle s'oppose au soulèvement fœtal des mamelons, que l'œstrogène injecté seul aurait provoqué ; on n'observe en général qu'un très léger soulèvement de la dernière paire de mamelons (encore s'agit-il simplement, très souvent, d'un phénomène d'inhibition mammaire) ou de rares mamelons pectoraux (nous renvoyons le lecteur au tableau VIII de ce travail de 1942, qui met en évidence ce phénomène).

Ces faits nous autorisent donc à conclure que les hormones androgènes, agissant pendant la vie fœtale, s'opposent à la formation de l'invagination épidermique mamelonnaire et au soulèvement du derme mamelonnaire. L'hormone mâle, agissant dans ces conditions, réalise donc une condition d'athélie.

Action des androgènes sur la mamelle des fœtus.

Les hormones androgènes injectées à la souris gravide dirigent dans le sens mâle l'évolution fœtale de la mamelle ; elles provoquent : α) la séparation des bourgeons mammaires d'avec l'épiderme ; β) la destruction de certains bourgeons mammaires.

α) Séparation provoquée, des bourgeons mammaires, d'avec l'épiderme.

Après injection de propionate de testostérone à la mère gravide, les ébauches mammaires inguinales et pectorales (à l'exception de celles qui sont détruites) des fœtus femelles se détachent de l'épiderme [31] ; ce processus de détachement se réalise suivant des processus semblables à ceux qui entrent en jeu normalement chez le fœtus mâle ; à la fin du jour 14 de la vie fœtale, on voit, chez les fœtus femelles provenant de mères ainsi traitées, une couronne dense de cellules mésenchymateuses qui se constitue autour de la base du bourgeon mammaire (fig. 10, pl. III) ; cette partie basale s'amineit progressivement et est bientôt réduite à un étroit cordon cellulaire (bien visible sur la fig. 10) ; ce cordon présente bientôt une constriction et se rompt en ce point à la fin du jour 14 ou au cours du jour 15 de la vie embryonnaire ; le bourgeon mammaire, ainsi détaché de l'épiderme, est désormais isolé dans le mésenchyme sous-jacent ; il va évoluer, là, en un petit cordon de taille réduite qui acquerra une lumière à sa partie basale et commencera à bourgeonner à l'extrémité distale, au voisinage du terme de la gestation.

Nous n'avons pas étudié systématiquement les effets de différentes doses d'hormone mâle, mais nous avons constaté que ce processus de séparation se réalisait chez tous les fœtus femelles ou les nouveau-nés femelles provenant de mères ayant reçu, à un

stade précoce, une dose de 12 à 35 mg de propionate de testostérone au cours de la gestation. Il s'agit d'ailleurs là, simplement, d'un phénomène de masculinisation des ébauches mammaires qui prennent la structure qui caractérise celle du mâle normal chez cette espèce (cette séparation semble être particulière à la souris ; nous ne l'avons pas rencontrée chez les mâles normaux des autres espèces de *muridés*, ou tout à fait exceptionnellement [1 cas seulement]) ; cependant cette séparation s'accompagne d'une réduction de taille des ébauches : le cordon mammaire, isolé dans l'épiderme, est en général moins développé que

PLANCHE I

Les photographies de cette planche montrent les principaux stades du développement embryonnaire normal de la mamelle de la souris, chez des fœtus de sexe femelle appartenant à la lignée XXX de M^{me} Dobrovolskaïa, et la morphologie de la mamelle chez le nouveau-né femelle normal.

FIG. 1. — Section histologique d'une ébauche mammaire d'un embryon femelle normal de souris, âgé de 12 jours 10 heures $\pm$ 6 h. 30, pesant 69,5 mg (Gr. = 229).

FIG. 2. — Section histologique de la première ébauche mammaire inguinale gauche d'un fœtus femelle de souris âgé de 13 jours 15 h. 30 $\pm$ 6 h. 30, pesant 162,1 mg ; la mamelle est ici au stade du bourgeon mammaire primitif (Gr. = 229).

FIG. 3. — Section histologique de la première ébauche mammaire inguinale gauche d'un fœtus femelle normal de souris, âgé de 15 jours 17 heures $\pm$ 6 heures, pesant 333 mg ; le bourgeon mammaire est maintenant enfoncé dans le mésenchyme et relié à l'ectoderme par une courte tige de cellules ectodermiques (Gr. = 229).

FIG. 4. — Section histologique de la première ébauche mammaire inguinale gauche d'un fœtus femelle normal de souris, âgé de 16 jours 11 h. 30 $\pm$ 6 h. 30, pesant 549 mg ; une ouverture apparaît dans la moitié supérieure de la tige épidermique qui relie le bourgeon mammaire à l'épiderme (Gr. = 229).

FIG. 5. — Section histologique de la première ébauche mammaire inguinale gauche d'un fœtus femelle normal de souris, âgé de 17 jours 13 heures $\pm$ 6 heures, pesant 726 mg ; la tige épidermique est maintenant ouverte dans toute sa longueur et la partie supérieure du bourgeon mammaire est maintenant insérée dans l'ectoderme ; le bourgeon s'est maintenant allongé (Gr. = 229).

FIG. 6. — Section histologique de la deuxième ébauche mammaire inguinale gauche d'un fœtus femelle normal de souris, âgé de 18 jours 15 heures $\pm$ 6 heures, pesant 1 111 mg ; le bourgeon mammaire a maintenant donné naissance à un cordon mammaire primaire attaché à l'épiderme (Gr. = 229).

FIG. 7. — Section histologique de la première ébauche mammaire inguinale gauche d'une souris femelle normale nouveau-née, âgée de 0 à 17 heures, pesant 1 602,8 mg de la lignée XLII de M^{me} Dobrovolskaïa ; l'ébauche est constituée par un long cordon primaire (ébauche du canal galactophore) qui est bifurqué puis ramifié à son extrémité distale (non visible sur la photographie) ; de part et d'autre de la base du cordon primaire, on distingue la section de l'invagination épithéliale ectodermique qui délimite l'ébauche du mamelon (Gr. = 85).

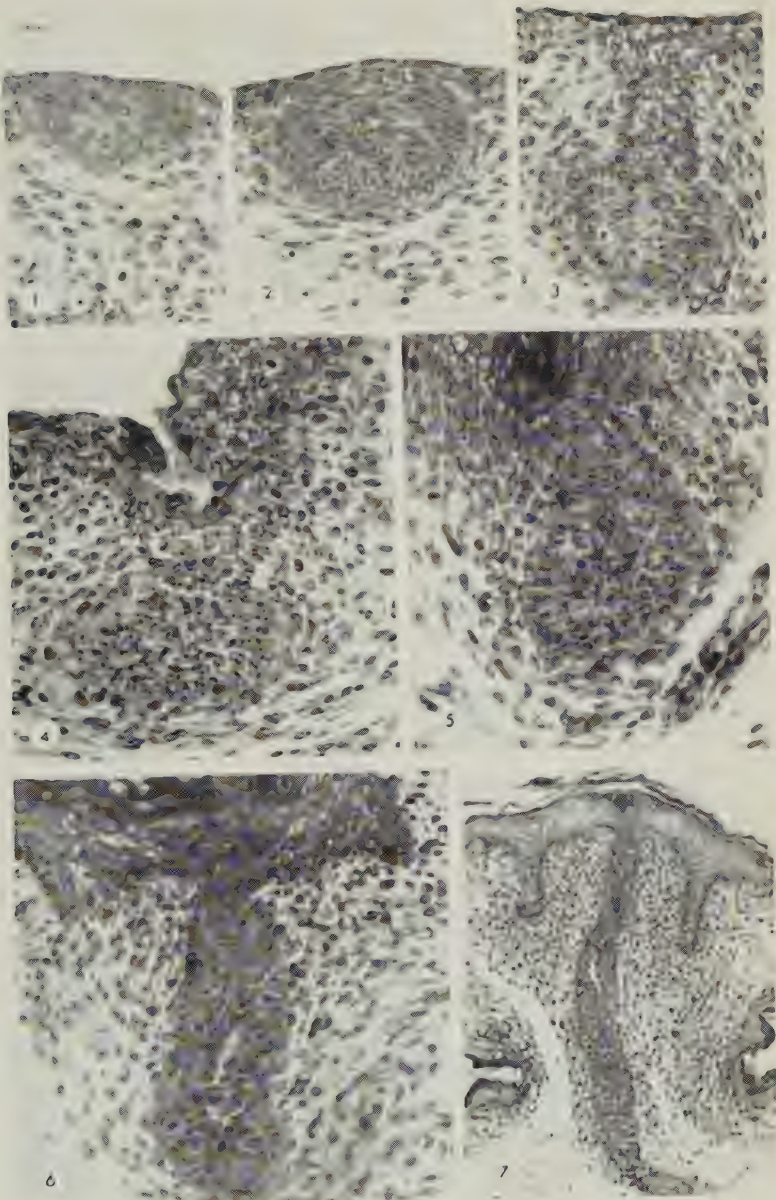


PLANCHE I.

PLANCHE II

Les photographies de cette planche montrent deux stades importants de l'histogénèse des ébauches mammaires des fœtus mâles, normaux, de souris : la séparation du bourgeon mammaire d'avec l'épiderme (fig. 8) et la destruction du bourgeon mammaire (fig. 9) qui se produit parfois chez ces fœtus.

FIG. 8. — Section de la première ébauche mammaire inguinale gauche d'un fœtus mâle, normal, de souris, de la lignée XVII, âgé de 15 jours 9 heures $\pm$ 8 heures, pesant 381,3 mg ; le bourgeon mammaire vient de se séparer de l'épiderme : la mince tige qui le reliait à l'épiderme vient d'être détruite et on aperçoit ses résidus ; noter l'abondante condensation mésenchymateuse autour de l'emplacement où se trouvait antérieurement la base du bourgeon mammaire, et les nombreuses pycnoses parmi les cellules de la condensation mésenchymateuse (Gr. = 383).

FIG. 9. — Section histologique de la deuxième ébauche mammaire inguinale droite du fœtus mâle, normal, de souris, n° 821 de la lignée XVII, âgé de 14 jours 14 heures $\pm$ 7 heures, pesant 276 mg. Noter la présence de nombreuses pycnoses dans le bourgeon mammaire et l'abondante condensation mésenchymateuse qui enveloppe totalement le bourgeon mammaire en voie de destruction ; des pycnoses existent également dans la condensation mésenchymateuse : les noyaux de beaucoup de cellules mésenchymateuses de cette condensation sont hypertrophiés, turgescents (Gr. = 383).

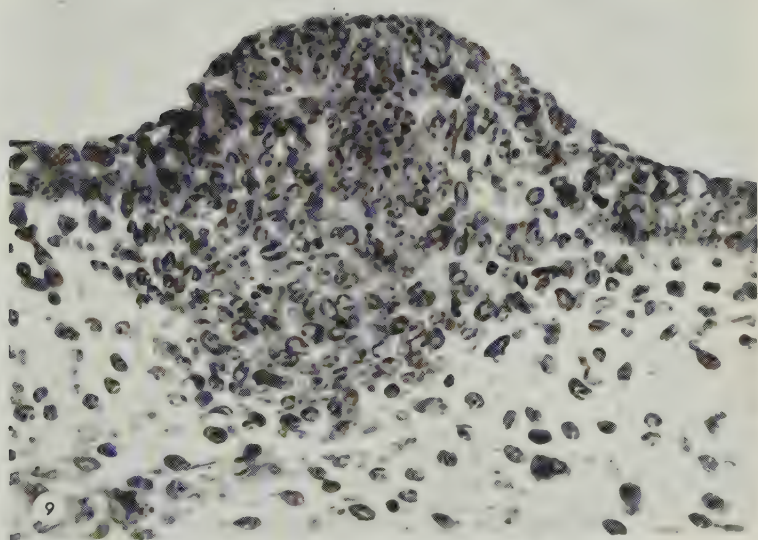
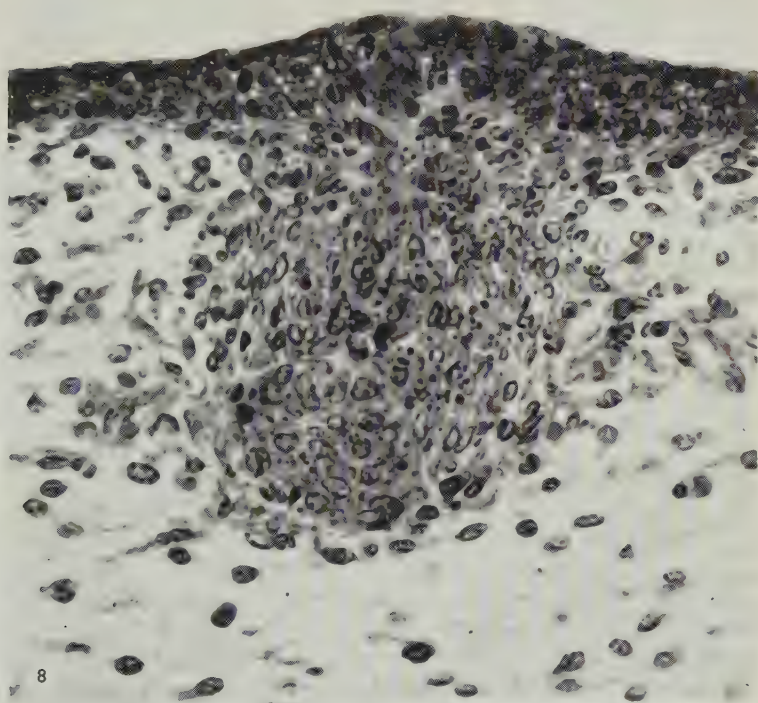


PLANCHE II.

PLANCHE III

Photographies de sections histologiques d'ébauches mammaires de fœtus femelles de souris, masculinisés à la suite d'une injection d'hormone androgène à la mère gravide.

FIG. 10. — Section de la première ébauche mammaire inguinale gauche d'un fœtus femelle de souris âgé de 14 jours 14 heures, pesant 213 mg (fœtus n° 896), provenant d'une mère ayant reçu 28,7 mg de propionate de testostérone entre le huitième et le dixième jour de la gestation ; le bourgeon mammaire est en train de se séparer de l'épiderme auquel il n'est plus relié que par une tige très étroite, qui est entourée par une condensation mésenchymateuse dense (Gr. = 549).

FIG. 11. — Section de la deuxième ébauche mammaire inguinale gauche du fœtus femelle précédent (n° 896) : ici le bourgeon mammaire est arrêté dans son développement ; noter la condensation mésenchymateuse enveloppant le bourgeon [les noyaux des cellules sont hypertrophiés] (Gr. = 547).

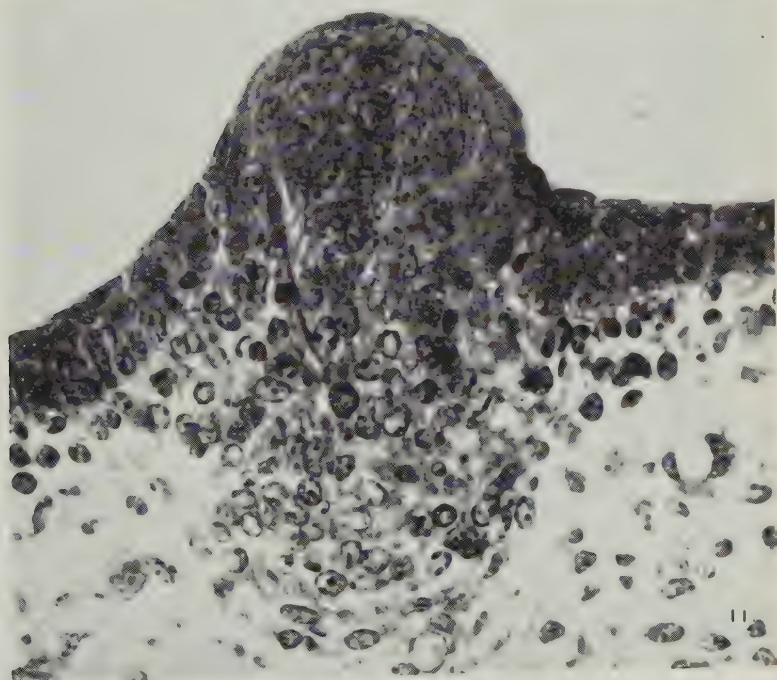
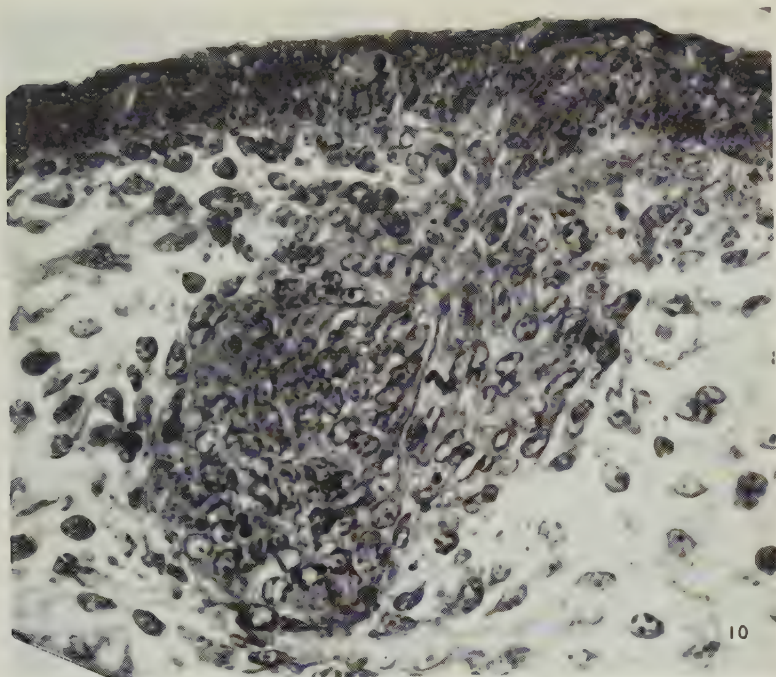


PLANCHE III.

PLANCHE IV

FIG. 12 à 16. — Sections histologiques d'ébauches mammaires d'un fœtus femelle témoin et d'un fœtus femelle normal.

FIG. 12 et 13. — Deux sections histologiques intéressant la première ébauche mammaire inguinale droite d'un fœtus femelle de souris âgé de 17 jours 12 heures $\pm$ 8 heures, pesant 778,2 mg ; ce fœtus avait reçu 1/80 de centimètre cube d'huile d'olive pure dans la cavité amniotique, à l'âge de 12 jours 8 h. 30 $\pm$ 8 heures ; ses glandes mammaires se sont normalement développées (Gr. = 142,5).

FIG. 14, 15 et 16. — Trois sections intéressant la deuxième ébauche mammaire inguinale gauche d'un fœtus femelle de souris, normal, âgé de 18 jours 15 heures, pesant 1 111 mg ; l'ébauche est attachée à l'épiderme sur la figure 14. Les figures 15 et 16 intéressent deux branches distinctes de l'ébauche (Gr = 142,5).

FIG. 17. — Section histologique médiane du deuxième mamelon inguinal gauche du fœtus femelle de souris n° 1666, âgé de 18 jours 9 heures $\pm$ 8 heures, pesant 773 mg ; ce fœtus avait reçu à l'âge de 13 jours 13 heures $\pm$ 8 heures, une injection de 94 γ de dipropionate d'oestradiol dans sa cage thoracique ; le mamelon est saillant, mais l'ébauche mammaire est absente (Gr. = 142,5).

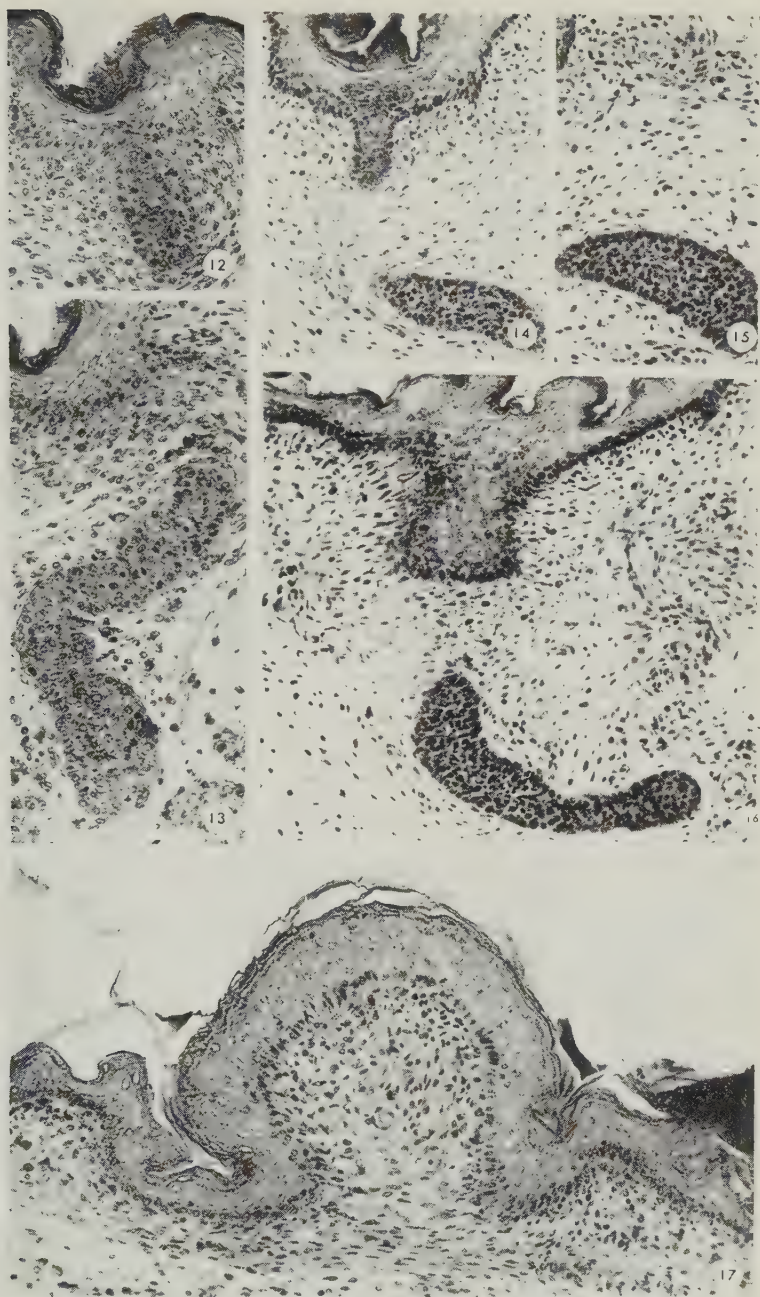


PLANCHE IV.

l'ébauche correspondante des fœtus femelles (cette constatation a été faite sur des ébauches inguinales de fœtus provenant de mères ayant reçu des doses élevées [35 à 47 mg] de propionate de testostérone ; nous n'avons pas recherché si cette action androgène prénatale influençait, ou non, le développement ultérieur de ces ébauches masculinisées [voir Discussion]).

β) Destruction, par les hormones androgènes, de certaines ébauches mammaires.

Ce phénomène reproduit celui qui a lieu, normalement, au niveau de certaines ébauches mammaires de fœtus mâles normaux de souris, dans certaines lignées.

Sous l'effet de doses de propionate de testostérone de 25 à 45 mg, injectées précocement à la mère gravide, certaines ébauches mammaires des fœtus femelles sont détruites (A. Raynaud, 1949 [25]) ; presque toujours les deux ébauches de la dernière paire inguinale subissent cette destruction ; nous avons pu saisir, chez des fœtus femelles âgés de 14 jours 15 heures, le processus de cette destruction [25] ; il est semblable à celui observé chez le mâle normal : un amas dense de cellules mésenchymateuses vient envelopper la totalité du bourgeon mammaire ; les cellules de ce dernier se tassent les unes contre les autres, des pycnoses apparaissent, la taille du bourgeon se réduit progressivement et ses restes sont ensuite refoulés à l'extérieur ; les cellules mésenchymateuses enveloppantes présentent, au cours de ce phénomène, des modifications de structure, en particulier

TABLEAU I. — Effet sur la dernière paire d'ébauches mammaires des fœtus de sexe femelle, de différentes doses de propionate de testostérone, injectées précocement à la souris gravide.

Dose de propionate de testostérone injectée à la Souris gravide. (mg.)	Nombre de fœtus ♀ ou de nouveau-nés ♀ étudiés.	Etat de la dernière paire (la plus caudale) d'ébauches mammaires des fœtus ♀ à terme ou des nouveau-nés ♀.
10	2	Présente chez ces 2 nouveau-nés.
12,5	1	Une ébauche présente, l'autre absente.
25	6	Absente chez 3 fœtus et 1 nouveau-né ; une ébauche sur deux, présente chez 2 autres fœtus.
35	2	Absente chez les deux fœtus.
47,5	4	Absente chez les 4 fœtus.

une hypertrophie et une turgescence nucléaire ; ces processus aboutissent à la suppression du bourgeon mammaire, réalisant ainsi une amastie secondaire ; la figure 11 de la planche III montre un aspect de l'inhibition d'un bourgeon mammaire d'un fœtus femelle âgé de 14 jours 15 heures, provenant d'une mère ayant reçu 28,75 mg de propionate de testostérone au cours de la gestation.

Nous avons étudié l'effet de différentes doses de propionate de testostérone, injectées précocement à la souris gravide, sur l'évolution de la II^e paire inguinale d'ébauches mammaires (paire d'ébauches la plus caudale) de fœtus ou de nouveau-nés de sexe femelle ; les résultats, résumés dans le tableau I, montrent que c'est à partir de doses de 25 mg de propionate de testostérone injectés à la mère, que la destruction de cette paire d'ébauches mammaires s'effectue. Il est possible qu'une influence génétique facilite cette destruction chez certaines souches de souris ; de nouvelles recherches devront être effectuées à ce sujet, en utilisant des souris appartenant à différentes lignées sélectionnées (1).

**B. — Action des hormones œstrogènes injectées au fœtus,
sur le développement fœtal
de la glande mammaire de la souris.**

Plus encore que les hormones androgènes, les hormones œstrogènes se sont montrées capables de provoquer une grande variété de malformations de la mamelle.

Rappelons tout d'abord, qu'au mois d'août 1938, Greene, Burrill et Ivy montraient [32], aux Etats-Unis, que les hormones œstrogènes injectées à la rate gravide déterminaient chez les fœtus des modifications importantes de la différenciation sexuelle et un développement prématuré des mamelons ; au mois d'octobre de la même année, l'un de nous obtenait aussi le développement prématuré des mamelons chez des fœtus de souris provenant de mères ayant reçu des injections d'une autre hormone œstrogène, l'équilénine [33] ; le même effet fut également obtenu, un peu plus tard, avec l'œstradiol [34]. A ces observations préliminaires ont fait suite des études plus détaillées, précisant le degré de déve-

(1) Chez deux fœtus femelles âgés de 15 jours 16 heures, pesant respectivement 350 et 312 mg, provenant d'une mère ayant reçu précocement des doses élevées de propionate de testostérone au cours de la gestation (10 mg les septième et dixième jours ; 12,5 mg le treizième jour), les ébauches de la II^e paire inguinale ne sont pas détruites, mais sont en train de se séparer de l'épiderme ; dans ce cas le passage de la mère au fœtus, de l'hormone mâle, a-t-il été trop tardif ou trop faible précocement ? ou bien des facteurs héréditaires sont-ils intervenus ?

loppement des différents mamelons, en fonction de la dose injectée, de l'époque de l'injection et du sexe des fœtus [35, 30].

Ultérieurement enfin, il fut établi que des composés œstrogènes synthétiques, tels que le diéthylstilbœstrol [36] ou le dihydrostilbœstrol [37], avaient, comme les hormones œstrogènes naturelles, la capacité de provoquer le développement prématuré des mamelons chez les fœtus de rat et de souris.

Dans tous les travaux que nous venons de citer, les observations effectuées portaient exclusivement sur les mamelons.

C'est en 1947 que l'un de nous eut la surprise de constater [38, 39] que les hormones œstrogènes, injectées précocement à la souris gravide, avaient la capacité d'altérer le développement de la glande mammaire des fœtus ; ainsi, l'examen microscopique des fœtus, provenant de mères ayant reçu 2 à 6 mg de dipropionate d'œstradiol pendant la gestation, révéla que les mamelles de ces fœtus avaient été partiellement ou totalement arrêtées dans leur développement : des mamelons saillants s'étaient développés, mais les sections histologiques de ces mamelons montraient l'absence totale de tissu mammaire, ou seulement un rudiment de cette glande.

Devant ces résultats inattendus, une étude plus approfondie des effets de l'hormone œstrogène sur le développement fœtal de la mamelle a été entreprise ; deux séries d'expériences ont été effectuées : l'un de nous a d'abord [40, 41] réalisé l'injection directe à l'embryon de doses de 40 à 250 γ de dipropionate d'œstradiol ; nous avons ensuite étudié les effets de l'injection, à la souris gravide, de doses d'hormone œstrogène s'échelonnant entre 50 γ et 10 mg. Nous exposerons maintenant les résultats obtenus dans la première série d'expériences ; les effets, sur la mamelle fœtale, de l'hormone œstrogène injectée à la mère gravide seront rapportés dans la deuxième partie de ce travail.

Injection directe d'hormone œstrogène à l'embryon de souris.

Procédé expérimental. — L'injection, au petit embryon de souris en développement dans l'utérus maternel, d'une quantité déterminée d'hormone, à des stades relativement précoces, constitue une opération délicate ; pour la réaliser commodément et avec précision, l'un de nous a réalisé [40, 41] un appareil (dont la description détaillée sera donnée ailleurs), qui consiste essentiellement en un support mobile, maintenant horizontalement une petite seringue ; on peut faire avancer ou reculer mécaniquement la seringue dans le plan horizontal, ou l'élever ou l'abaisser pour l'amener à la hauteur voulue ; un bouton moleté permet de l'immobiliser dans la position choisie ; à l'extrémité de la seringue est adaptée (maintenue par un rodage fin de l'intérieur de la base de l'aiguille et de la partie antérieure de la seringue) une petite aiguille de verre à pointe très effilée ; on remplit d'abord, avec la

solution huileuse d'hormone œstrogène à injecter, la seringue et on la fixe sur son support mobile. Ceci fait, une souris gravide à un stade déterminé de la gestation, est anesthésiée à l'éther et maintenue, par des liens de caoutchouc, couchée sur le dos sur une planchette de liège ; une incision médiane de la peau ventrale et de la paroi abdominale est effectuée ; elle permet de retirer et d'écarter latéralement une corne utérine gravide ; cette corne est alors immobilisée, au moyen de deux tiges métalliques, sur un support fixé à l'avant de l'appareil qui supporte la seringue ; un éclairage convenable permet de distinguer aisément par transparence à travers la paroi utérine, le petit embryon dans le liquide amniotique ; on choisit, en général, pour l'injection un embryon couché sur le dos ; la seringue et l'extrémité de l'aiguille ayant été, par un réglage convenable, amenés face à l'embryon et à sa hauteur, il suffit alors de faire avancer horizontalement, tout doucement la seringue vers l'embryon : la pointe effilée de l'aiguille pénètre ainsi dans la paroi de la corne utérine qu'elle traverse, puis à travers les enveloppes fœtales et arrive enfin au contact de la paroi abdominale ou thoracique de l'embryon ; on fait alors avancer très légèrement la seringue, de 1 mm environ ; on voit très bien la pointe de l'aiguille de verre s'enfoncer dans la paroi abdominale (ou thoracique) de l'embryon ; on immobilise alors la seringue en agissant sur le bouton moleté ; on pousse l'injection dans l'embryon en observant sur la seringue la longueur dont avance le piston ; ceci fait, on débloque le bouton moleté ; et on ramène en arrière la seringue ; on replace ensuite la corne utérine dans la cavité abdominale de la mère ; on recoud l'incision musculaire abdominale, on referme l'incision cutanée avec de petites agrafes métalliques et on arrête l'anesthésie ; avec précaution, la souris est replacée dans sa cage (dans une boîte en carton contenant une couche de coton) ; la souris abondamment nourrie (pain, grains d'avoine, salade et eau) est laissée sans traitement jusqu'au voisinage du terme de la gestation ; elle est sacrifiée quelques heures seulement avant la date calculée du terme ; les fœtus sont retirés hors de la corne utérine, après avoir noté et repéré l'emplacement du ou des embryons injectés. Les fœtus sont pesés (à l'aide d'une balance sensible au 1/10 de milligramme) aussitôt après avoir été extraits hors de la corne (dès qu'un fœtus est retiré, il est pesé), examinés à la loupe binoculaire, sacrifiés, autopsiés et immergés dans un liquide fixateur (liquide de Bouin, ou de Zenker-formol-acide acétique) ; ils sont ensuite débités en coupes séries à 7,5 μ ou à 10 μ et étudiés microscopiquement.

L'hormone œstrogène utilisée dans ces expériences est du dipropionate d'œstradiol purissime, préparé spécialement pour les recherches de laboratoire par les Laboratoires Roussel ; les constantes physiques de ce corps sont : point de fusion $F = 103^{\circ}$ (bloc) et pouvoir rotatoire $(\alpha)_D = +38^{\circ}5$. Nous avons utilisé cette substance en solution, à 15 mg par centimètre cube, dans l'huile d'olive pure.

Cent cinquante-neuf embryons de souris ont été injectés par ce procédé, à l'âge de 12 à 15 jours (2) et avec des doses de

dipropionate d'œstradiol comprises entre 40 et 250 γ ; la mortalité a été assez élevée dans cette série d'expériences, soit que l'embryon injecté soit mort plus ou moins précocement, soit que la gestation entière ait été interrompue ; voici le nombre d'embryons injectés aux différents âges et le nombre d'embryons ayant survécu à l'opération :

56 embryons ont été injectés à l'âge de 12 jours et quelques heures ; 1 seul a survécu et a été sacrifié à l'âge de 17 jours et quelques heures.

94 embryons ont été injectés à l'âge de 13 jours et quelques heures ; 27 ont survécu et ont été sacrifiés au voisinage du terme de la gestation [25] ou au quinzième jour [2].

5 embryons ont été injectés à l'âge de 14 jours et quelques heures ; 3 ont survécu et ont été sacrifiés au terme de la gestation.

4 embryons ont été injectés à l'âge de 15 jours et quelques heures ; tous ont été sacrifiés au voisinage du terme de la gestation.

Comme l'indiquent ces chiffres, la mortalité a été très élevée lorsque ces injections ont été faites à des stades précoces (13 et surtout 12 jours) ; il est vraisemblable que c'est la contraction du muscle utérin, provoquée par l'œstrogène, qui provoque la mort de l'embryon à ces stades précoces ; lorsque l'injection a lieu au stade de 12 jours, on trouve souvent des cornes utérines contractées, au moment du sacrifice de la mère ; à leur intérieur on retrouve des débris noirâtres représentant les restes des embryons nécrosés ; la taille de ces amas et des placentas indique que la mort des embryons a dû se produire rapidement après l'injection ; souvent dans les portées dont 1 à 4 embryons ont été injectés à l'âge de 12 jours, tous les embryons sont trouvés morts, très petits et nécrosés, au moment du sacrifice de la mère au voisinage du terme de la gestation ; il est vraisemblable que la mort

(2) L'âge de l'embryon est ainsi calculé : la souris femelle, préalablement isolée pendant deux à trois semaines, est mise avec un mâle, le soir vers 18 heures ; le mâle est enlevé le lendemain matin vers 9 heures ; le bouchon vaginal est recherché, sa présence indique que la copulation a eu lieu ; on choisit comme heure de fécondation, le milieu de l'intervalle de temps écoulé entre le moment où le mâle est mis avec la femelle et celui où il est retiré de la cage ; on donne comme heure de fécondation, environ 1 à 3 heures du matin suivant les cas et ce choix permet de connaître l'âge de l'embryon à plus ou moins 6 ou 8 heures près ; vingt-quatre heures après cette heure de fécondation ainsi calculée, l'embryon est âgé de 1 jour.

Dans la plupart des cas, d'ailleurs, cette méthode permet sans doute de connaître l'âge de l'embryon avec une approximation de l'ordre de deux ou trois heures (voir A. Raynaud, 1942 [30], p. 12).

des embryons a été provoquée, dans ce cas, par une contraction généralisée des cornes utérines ; parfois ce sont seulement les embryons voisins de l'embryon injecté qui sont morts ; dans ce cas la mort peut être due aussi soit à une contraction plus localisée de l'utérus, soit à l'action des produits de nécrose de l'embryon injecté qui serait mort le premier.

Lorsque l'injection a lieu à l'âge de 13 jours, la mortalité est déjà moindre : 27 embryons ont survécu, sur 94 injectés ; et il faut retrancher du chiffre 94, 7 embryons appartenant à deux portées dont la mère a succombé à la fin de l'opération par suite d'une anesthésie à l'éther trop poussée.

Aux stades de 14 et de 15 jours, la mortalité devient beaucoup plus faible.

Tous les fœtus survivants, arrivés à terme, ont été fixés et étudiés histologiquement ; mais certains d'entre eux ont été écartés de cette étude, principalement parce que quelques-uns présentaient, à terme, un retard de développement notable (soit que ce retard soit dû à un effet indirect de l'action hormonale, soit qu'il soit dû à la présence d'un embryon voisin nécrosé dans l'utérus, soit à d'autres causes).

TABLEAU II. — Injection directe de dipropionate d'œstradiol à l'embryon de souris âgé de 12 jours et quelques heures.

Âge de l'embryon au moment de l'injection.	Volume de la solution huileuse d'hormone (x) injecté à l'embryon.	Localisation de l'injection.	Quantité de dipropionate d'œstradiol injectée à l'embryon.	Etat du fœtus injecté, au moment du sacrifice de la mère.			
				Âge	poids	sexe et état	N° de prélèvement
12 jours 13 heures ± 8 heures	$\frac{1}{320}$ cm ³	dans la cavité abdominale en enfonçant la pointe de l'aiguille dans le flanc gauche de l'embryon, un peu au dessus de la patte antérieure gauche.	46,8 γ	17 jours 10 heures ± 8 h.	935,2 mg.	♂ vivant	1753

(x) La solution hormonale utilisée pour ces injections est une solution de dipropionate d'œstradiol purissime [$F = 103^\circ$ et $(\alpha)_D = + 38^\circ 5$ (dioxane)], à 15 mg par centimètre cube.

Finalement, 1 embryon injecté à l'âge de 12 jours, 16 embryons injectés à l'âge de 13 jours (8 ♂ et 8 ♀), 3 embryons (1 ♀ et 2 ♂) injectés à l'âge de 14 jours et 4 embryons (♀) injectés à l'âge de 15 jours ont été étudiés du point de vue de leur appareil mammaire ; les doses d'hormone œstrogène injectées ont varié entre 40 et 250 γ, la majorité d'entre elles étant comprise entre 50 et 100 γ. Les tableaux II à V résument les conditions de ces expériences (âge de l'embryon au moment de l'injection, volume de la solution huileuse injectée et quantité d'hormone qu'elle contient, état des fœtus au moment du sacrifice de la mère).

Les précisions suivantes doivent être ajoutées à la lecture de ces tableaux : dans la portée du fœtus n° 1753, injecté à 12 jours, il y avait deux autres embryons injectés (47 γ de dipropionate d'œstradiol

TABLEAU III. — Injection directe de dipropionate d'œstradiol à l'embryon de souris âgé de 13 jours et quelques heures.

N° de la portée.	Age de l'embryon au moment de l'injection	Volume de solution huileuse d' hormone(x) injecté à l'embryon.	Localisation de l'injection(xx).	Quantité de dipropionate d'œstradiol injectée à l'embryon.	Etat des fœtus injectés, de la portée, au moment du sacrifice de la mère.			
					Age	Poids	Sexe et état.	N° de prélèvement
1	13 jours 9 heures 30 ± 8 h.30.	$\frac{1}{160}$ cm ³	sous le péritoine de la cavité abdominale et dans la cavité amniotique.	93,7 γ	18 jours 8 heures ± 8 h.30	723,4 mg	♀-vivant	I641
	id.	$\frac{1}{200}$ cm ³	dans la cavité abdominale (en pénétrant par le flanc droit de l'embryon).	75 γ	id.	1106,7 mg.	♂-vivant	I647
	id.	$\frac{1}{240}$ cm ³	dans la cavité abdominale (en pénétrant par le flanc gauche de l'embryon).	62,5 γ	id.	941,1 mg.	♂-vivant	I646
2	13 jours 11 heures ± 8 h.30.	$\frac{1}{200}$ cm ³	dans la cavité abdominale (en enfonçant la pointe de l'aiguille dans le flanc gauche de l'embryon, en arrière du foie).	75 γ	18 jours 9 heures ± 8 h.30	1087,5 mg.	♀-vivant	I657
	id.	$\frac{1}{200}$ cm ³	dans la cage thoracique (en pénétrant par la partie dorsale du flanc droit).	75 γ	id.	1174,5 mg.	♀-vivant	I656
	...	$\frac{1}{100}$ cm ³	dans la cavité amniotique et ? (la pointe de l'aiguille a été enfoncée dans le flanc gauche de l'embryon; la solution huileuse n'a pas été retrouvée à l'autopsie).	150 γ	id.	921,3 mg.	♀-vivant	I659
3	13 jours 13 heures ± 8 heures	$\frac{1}{160}$ cm ³	dans la cavité abdominale, (en enfonçant la pointe de l'aiguille près de la base de la patte postérieure gauche de l'embryon).	93,7 γ	18 jours 9 heures ± 8 h.	1076,0 mg.	♀-vivant	I662
	id.	$\frac{1}{160}$ cm ³	dans la cage thoracique, (en pénétrant par le flanc droit de l'embryon).	93,7 γ	id.	773,0 mg.	♀-vivant	I666
	id.	$\frac{1}{160}$ cm ³	sous le péritoine, près du rein droit, (en pénétrant par le flanc gauche de l'embryon, près de la base de la patte postérieure gauche).	93,7 γ	id.	730,8 mg.	♂-vivant	I667

(x) La solution hormonale, utilisée pour ces injections, est une solution de dipropionate d'œstradiol purissime [F = 103° (bloc) et (x)_D = + 38°5 (dioxane)], à 15 mg par centimètre cube dans l'huile d'olive.

(xx) La localisation est déterminée d'après le point de pénétration de la pointe de l'aiguille dans l'embryon au moment de l'injection et d'après la position des restes de la solution huileuse que l'on découvre à l'autopsie des fœtus.

chacun), qui sont morts. Pour les embryons injectés à 13 jours (tableau III), il y avait également, dans certaines portées, d'autres embryons injectés qui sont morts peu de temps après l'injection : dans la portée n° 2 du tableau III, il y avait un autre embryon injecté (75 γ) qui est mort ultérieurement ; dans la portée n° 4, il y avait un autre embryon qui avait reçu 94 γ de dipropionate d'œstradiol et

qui est mort ultérieurement ; dans la portée n° 5, il y avait deux autres embryons, ayant reçu chacun 100 γ de dipropionate d'œstradiol,

TABLEAU III (suite). — Injection directe de dipropionate d'œstradiol à l'embryon de souris âgé de 13 jours et quelques heures.

N° de la portée.	Âge de l'embryon au moment de l'injection	Volume de solution huileuse d'hormone (x) injecté à l'embryon.	Localisation de l'injection(xx)	Quantité de dipropionate d'œstradiol injectée à l'embryon	Etat des foetus injectés, de la portée, au moment du sacrifice de la mère.			
					Âge	poids	sexe et état	N° de prélèvement
4	13 jours 11 heures ± 8 h.30	$\frac{1}{160}$ cm ³	dans la cage thoracique, en pénétrant par le flanc gauche de l'embryon.	93,7 γ	18 jours 9 heures ± 8h.30	1040,8 mg.	♂.vivant	1680
	id.	$\frac{1}{160}$ cm ³	dans la cavité abdominale et dans le liquide amniotique (pénétration près de la base de la patte postérieure gauche de l'embryon)	93,7 γ	id.	1090,3 mg.	♂.vivant	1682
5	13 jours 12 heures ± 8h.30	$\frac{1}{150}$ cm ³	dans la cavité abdominale (huile non retrouvée à l'autopsie) et dans le liquide amniotique, pointe de l'aiguille enfoncée près du bord dorsal de la patte postérieure gauche de l'embryon.	100 γ	18 jours 9 heures ± 8h.30	non pesé ; (distance sommet du crâne anus = 19,8 mm.)	q.vivant	1687
6	13 jours 13 h. 30 ± 8 h.30	$\frac{1}{350}$ cm ³ (environ)	injection faite dans le flanc droit en pénétrant près de la base de la patte postérieure droite (injection non retrouvée à l'autopsie).	45 γ (environ)	18 jours 8h.30 ± 8h.30	1205,7 mg.	q.vivant	1691
7	13 jours 13 h.30 ± 8 h.30	$\frac{1}{160}$ cm ³	dans la cavité abdominale en enfonçant la pointe de l'aiguille près de la base de la patte postérieure gauche de l'embryon.	93,7 γ	18 jours 10 heures ± 8h.30	864,8 mg.	♂.vivant	1696
	id.	$\frac{1}{160}$ cm ³	dans la cavité abdominale en enfonçant la pointe de l'aiguille près de la base de la patte postérieure gauche de l'embryon (solution huileuse non retrouvée à l'autopsie).	93,7 γ	id.	698,0 mg.	♂.vivant	1697
8	13 jours 9 heures 30 ± 8 h.30	$\frac{1}{160}$ cm ³	dans la cavité abdominale en enfonçant la pointe de l'aiguille de verre près de la base de la patte postérieure gauche de l'embryon.	93,7 γ	18 jours 14 heures ± 8 h.30	1078,0 mg.	♂.vivant	1700
	id.	$\frac{1}{160}$ cm ³	dans la cavité abdominale en enfonçant la pointe de l'aiguille près de la base de la patte postérieure gauche de l'embryon (quelques gouttelettes de la solution injectée sont ressorties dans le liquide amniotique).	93,7 γ	id.	1213,3 mg.	♂.vivant	1701

(x) La solution hormonale, utilisée pour ces injections, est une solution de dipropionate d'œstradiol purissime [F = 103° (bloc) et (α)_D = + 38°5 (dioxane)], à 15 mg par centimètre cube, dans l'huile d'olive.

(x x) La localisation est déterminée d'après le point de pénétration de la pointe de l'aiguille dans l'embryon au moment de l'injection et d'après la position des restes de la solution huileuse que l'on découvre à l'autopsie des foetus.

qui sont morts ; dans la portée n° 7, il y avait un autre embryon, ayant reçu 94 γ de dipropionate d'œstradiol, qui est mort. Pour les foetus injectés à l'âge de 14 jours (tableau IV), dans la portée n° 1, il y avait un autre embryon, ayant reçu 250 γ de dipropionate d'œstradiol, qui est mort précocement ; dans la portée n° 2 de ce tableau IV.

il y avait un autre embryon ayant reçu 62 γ , qui est mort également, après l'injection.

Pour toutes ces portées, la mère gravide a été sacrifiée au stade de 18 jours et quelques heures, c'est-à-dire quelques heures seulement avant la date calculée du terme normal de la gestation ; l'âge des fœtus, indiqué dans les tableaux, est l'âge qu'ils avaient au moment du sacrifice de la mère ; comme le prélèvement des fœtus, leur mensuration, leur examen à l'état vivant, durent parfois plus

TABLEAU IV. — Injection directe de dipropionate d'œstradiol à l'embryon de souris âgé de 14 jours et quelques heures.

N° de la portée.	Âge de l'embryon au moment de l'injection.	Volume de la solution huileuse d'hormone (x)	Localisation de l'injection(xx)	Quantité de dipropionate d'œstradiol injectée à l'embryon.	Etat des fœtus injectés, de la portée, au moment du sacrifice de la mère.			
					âge	poids	sexe et état	N° de prélèvement.
1	14 jours 10 heures ± 9 h.	$\frac{1}{60}$ cm ³	dans le flanc droit du fœtus et dans la cavité amniotique.	250 γ	18 jours 9 heures ± 8 h.30	838,7 mg.	♂ vivant	1634
2	14 jours 11 heures30 ± 8 h. 30	$\frac{1}{160}$ cm ³	dans la cavité abdominale du fœtus en enfonçant la pointe de l'aiguille à la base de la patte postérieure gauche.	93,7 γ	18 jours 16 heures ± 8h.30	1017,8 mg.	q. vivant	1649
	id	$\frac{1}{240}$ cm ³	dans le flanc gauche, en enfonçant la pointe de l'aiguille au dessous de la base de la patte postérieure gauche (huile non retrouvée à l'autopsie); une gouttelette de la solution injectée, est allée dans la cavité amniotique.	62,5 γ	id.	967,3 mg.	♂ vivant	1652

(x) La solution hormonale, utilisée pour ces injections, est une solution de dipropionate d'œstradiol purissime [F = 103° (bloc) et (α)_D = + 38°5 (dioxane)], à 15 mg par centimètre cube dans l'huile d'olive.

(xx) La localisation est déterminée d'après le point de pénétration de la pointe de l'aiguille dans l'embryon au moment de l'injection et d'après la position des restes de la solution huileuse que l'on découvre à l'autopsie.

d'une heure (ou deux dans certains cas), tous les fœtus sont en réalité âgés de 1 heure ou 2 de plus que l'âge indiqué dans les tableaux. A l'autopsie des fœtus, des restes de la solution huileuse injectée ont été généralement retrouvés et leur position (abdominale ou thoracique) a été soigneusement notée. Tous les fœtus injectés présentaient, à terme, des mamelons plus ou moins développés (sauf ceux injectés à 15 jours) ainsi que divers indices de l'effet œstrogène sur leur tractus uro-génital ; en particulier les fœtus de sexe mâle étaient féminisés à des degrés divers : en général leurs testicules n'étaient pas descendus, des canaux de Müller étaient présents à des degrés variables de développement et leurs organes génitaux externes avaient pris une morphologie féminine ou intersexuée ; les fœtus femelles présentaient également des modifications des organes sexuels ; la description de ces changements fera l'objet d'un autre travail. Nous indiquons ici pour chaque fœtus, son numéro de prélèvement afin de permettre au lecteur de retrouver ultérieurement les caractéristiques sexuelles de ces fœtus. qui seront données dans une autre publication. Tous ces fœtus ont été, après fixation, inclus dans la paraffine et débités en coupes sérieées

(à 7,5 μ pour la région abdominale, à 7,5 μ ou 10 μ pour la région thoracique).

TABLEAU V. — Injection directe de dipropionate d'œstradiol à l'embryon de souris âgé de 15 jours et quelques heures.

Age de l'embryon au moment de l'injection.	Volume de la solution huileuse d'hormone (X) injecté à l'embryon	Localisation de l'injection (XX)	Quantité de dipropionate d'œstradiol injectée à l'embryon.	Etat des fœtus injectés, de la portée au moment du sacrifice de la mère.			
				Age	Poids	Sexe et état.	N° de prélèvement
15 jours 9 heures $\pm$ 8 h. 30	$\frac{1}{160}$ cm ³	dans la cavité abdominale en pénétrant dans le flanc gauche, près de la base de la patte postérieure gauche.	93,7 γ	18 jours 9 heures $\pm$ 8 h. 30	808,4 mg.	♀ vivant	1736
id.	$\frac{1}{160}$ cm ³	id.	id.	id.	848,0 mg.	id.	1737
id.	$\frac{1}{160}$ cm ³	id.	id.	id.	829,9 mg.	id.	1740
id.	$\frac{1}{160}$ cm ³	dans la cavité abdominale en pénétrant par le flanc droit, près de la base de la patte postérieure droite.	id.	id.	714,0 mg.	id.	1741

(X) La solution hormonale, utilisée pour ces injections, est une solution de dipropionate d'œstradiol purissime [F = 103° (bloc) et (α)_D = + 38°5 (dioxane)], à 15 mg par centimètre cube, dans l'huile d'olive.

(XX) La localisation est déterminée d'après le point de pénétration de la pointe de l'aiguille dans l'embryon au moment de l'injection et d'après la position des restes de la solution huileuse que l'on découvre à l'autopsie des fœtus.

Nous avons complété cette série expérimentale par l'étude des fœtus de deux autres portées : ces embryons avaient reçu au cours d'expériences antérieures (effectuées en 1941 et 1942) une injection d'hormone œstrogène, réalisée au moyen d'une seringue, tenue à la main, sans l'aide d'un appareil ; dans la première portée, 3 embryons avaient reçu, à l'âge de 14 jours 14 h. 30 $\pm$ 6 h. 30, une injection de 1/80 de centimètre cube d'une solution huileuse contenant 15 mg de dipropionate d'œstradiol par centimètre cube ; la mère gravide avait été sacrifiée au stade de 19 jours 7 h. 30 $\pm$ 6 h. 30 ; les 3 fœtus injectés étaient vivants ; il y avait 2 ♂ (fœtus n° 959, pesant 947 mg et fœtus n° 961, pesant 1 196 mg) et 1 ♀ (fœtus n° 960, pesant 1 076 mg) ; dans la deuxième portée, 4 embryons avaient reçu 50 γ de dipropionate d'œstradiol (1/200 de centimètre cube d'une solution huileuse à 10 mg par centimètre cube) à l'âge de 15 jours 10 h. 30 $\pm$ 8 h. 30 ; la mère gravide a été sacrifiée à l'âge de 19 jours 11 h. 30 $\pm$ 8 h. 30 ; les 4 fœtus injectés étaient vivants : il y avait 3 ♂ pesant respectivement 955 mg, 1 084 mg et 1 325 mg, et 1 ♀ pesant 1 125 mg (fœtus n° 868). Tous ces fœtus ont été étudiés histologiquement, sur coupes sériées.

Fœtus témoins. — Pour servir de témoins dans cette expérience, nous avons utilisé quatre catégories d'animaux :

a) Des fœtus non injectés, appartenant à la même portée que les fœtus injectés ; mais dans ce cas une difficulté existe : en général, en effet, un certain nombre de fœtus non injectés ont été contaminés, pendant la vie fœtale, par l'hormone injectée aux autres fœtus, et ils présentent à terme des mamelons (voir [40]) ; ils ne peuvent donc servir de témoins ; nous avons donc choisi comme témoins quelques

foetus non injectés ne présentant, à terme, aucun indice de stimulation hormonale (pas de mamelons, pas de modifications de l'appareil génital) ; les ébauches mammaires de ces foetus étaient normales.

b) Des foetus ayant reçu une injection d'huile d'olive : 4 souris femelles gravides ont été laparotomisées, sous anesthésie à l'éther, à un stade connu de la gestation et certains de leurs foetus ont reçu une injection d'huile d'olive pure, les autres foetus ne recevant pas d'injection ; la mère gravide a été sacrifiée au voisinage du terme de la gestation, les foetus prélevés, examinés, fixés et étudiés ; malheureusement, tous les foetus injectés à l'âge de 13 jours (13 foetus, appartenant à trois portées différentes) sont morts (dans une portée il y a eu expulsion des embryons, dans une autre la mère a présenté une éventration le lendemain de l'opération ; dans la troisième, les embryons injectés et deux embryons voisins ont été trouvés morts, petits et nécrosés à terme ; les embryons non injectés étaient vivants). Dans le cas de la quatrième femelle, 4 foetus avaient reçu 1/80 à 1/120 de centimètre cube d'huile d'olive pure dans leur cavité abdominale à l'âge de 14 jours 9 h. 30 $\pm$ 8 h. 30 ; ils étaient tous vivants au moment du sacrifice de la mère gravide à 18 jours 16 h. $\pm$ 8 h. 30 [voir tableau VI] ; leurs ébauches mammaires ont été étudiées histologiquement sur coupes sériees.

TABLEAU VI. — Injection directe d'huile d'olive pure à l'embryon de souris âgé de 14 jours et quelques heures.

Age de l'embryon au moment de l'injection	Volume d'huile d'olive injecté	Localisation de l'injection	Etat des foetus injectés, de la portée, au moment du sacrifice de la mère.			
			Age	poids	sexe et état	N° de prédivement
14 jours 9 heures 30 $\pm$ 8 h. 30	$\frac{1}{80}$ cm ³	dans la cavité abdominale en enfonçant la pointe de l'aiguille près de la base de la patte postérieure gauche.	18 jours 16 heures $\pm$ 8 h. 30	935,8mg.	♂ vivant	1653
id.	$\frac{1}{120}$ cm ³	idem (mais pendant l'injection, une gouttelette d'huile va dans la cavité amniotique).	id.	749,1 mg.	♀ vivant	1654
id.	$\frac{1}{80}$ cm ³	dans la cavité abdominale en enfonçant la pointe de l'aiguille près de la base de la patte postérieure droite ; quelques gouttelettes d'huile ressortent dans la cavité amniotique.	id.	1075,2mg.	♀ vivant	1655
id.	$\frac{1}{80}$ cm ³	dans la cavité abdominale en enfonçant la pointe de l'aiguille près de la base de la patte postérieure gauche ; une goutte d'huile ressort dans la cavité amniotique.	id.	969,5mg.	♀ vivant	1656

c) Des foetus ayant reçu une injection de 1/60 ou de 1/80 de centimètre cube d'huile d'olive dans la cavité amniotique, à l'âge de 12 jours 8 h. 30 $\pm$ 8 heures ; ces foetus ont été sacrifiés à l'âge de 17 jours 12 h. 30 $\pm$ 8 heures ; il y avait 1 foetus ♂ (n° 1530) pesant 816,4 mg ayant reçu 1/60 de centimètre cube d'huile d'olive pure ; 1 foetus ♂ (n° 1531) pesant 833,7 mg ayant reçu 1/80 de centimètre cube d'huile d'olive ; 1 foetus ♀ (n° 1533) pesant 778,2 mg ayant reçu 1/80 de centimètre cube d'huile d'olive. Tous ces foetus ont été étudiés histologiquement.

d) Des foetus à terme et des souris nouveau-nées des deux sexes, normales. 100 ébauches mammaires de 10 souris femelles nouveau-nées

normales appartenant à 3 lignées différentes ont été étudiées sur coupes sérieées ; et 208 ébauches mammaires de souris femelles nouveau-nées normales appartenant à 5 lignées distinctes ont été examinées sur quelques sections histologiques de leur région médiane.

La structure de ces ébauches sera examinée dans un paragraphe spécial. Mentionnons simplement ici qu'à l'exception de 4 glandes (appartenant à 3 nouveau-nés de la même portée), qui présentaient une anomalie très particulière, les autres mamelles avaient une structure normale ou ne présentaient que de légères modifications ne représentant pas d'anomalie de la morphogénèse de la glande.

RÉSULTATS OBTENUS.

Nous décrirons successivement les effets de l'hormone œstrogène sur la glande mammaire des fœtus de sexe femelle, puis sur celle des fœtus de sexe mâle : et dans chaque sexe nous étudierons d'abord l'action de l'hormone sur les mamelons, puis sur la mamelle.

a) Malformations mammaires observées chez les fœtus de sexe femelle.

a) Effet sur les mamelons. — Rappelons d'abord que ces injections d'hormone œstrogène à l'embryon ont provoqué un développement prématuré des mamelons [40] lorsque l'injection a été faite à l'embryon âgé de 12 à 14 jours ; le développement des mamelons est important lorsque l'injection est faite à 12 ou à 13 jours ; il est faible lorsque l'injection est faite à 14 jours (seule la dernière paire de mamelons réagit nettement en devenant saillante) ; il est à peu près nul lorsque l'injection est faite au fœtus âgé de 15 jours.

La structure des mamelons devenus prématurément saillants, sous l'effet œstrogène, apparaît sur les figures 17 (pl. IV) et 18 à 20 (pl. V) : une forte saillie du derme est recouverte par un épiderme épaissi ; la surface externe du mamelon est tantôt régulièrement convexe, tantôt conique ; chez les mamelons les plus développés, la hauteur de la saillie peut atteindre 300 μ et son diamètre à la base, 300 à 350 μ .

Les fœtus traités présentent d'assez grandes variations quant au degré de développement de leurs mamelons ; ces variations tiennent au sexe du fœtus, à son âge au moment de l'injection, à la position du mamelon considéré et à la dose injectée ; nous avons montré antérieurement (A. Raynaud, 1952 [40]) quelle était l'influence de ces divers facteurs et apporté des résultats quantitatifs (voir le tableau de la page 407 [30]). Il est possible que l'absence du soulèvement de l'aire mamelonnaire, constatée chez plusieurs fœtus injectés précocement (voir le tableau de la publi-

cation de 1952 [30]), soit liée aux transformations subies par cette aire, en particulier à l'invagination, parfois profonde, que forme l'épiderme de l'aire mammaire sous l'action œstrogène ; nous n'insisterons pas ici sur ce point.

Les principales malformations du mamelon, provoquées par les hormones œstrogènes, peuvent être groupées en deux catégories :

Le développement fœtal, prématuré, des mamelons, sous l'action œstrogène, s'accompagne d'une modification du mode de formation du mamelon : normalement le mamelon est délimité, comme l'ont bien montré Turner et Gomez [49], par une invagination circulaire de l'épiderme, qui se constitue autour du cordon mammaire primaire, chez les fœtus femelles âgés de 18 jours ; cette invagination va croître rapidement en profondeur, en s'épaississant ; et ce n'est que vers la quatrième semaine après la naissance que, à la suite d'un processus de desquamation centrale, les deux lames épithéliales de l'invagination se sépareront, libérant ainsi le mamelon. Or, chez les fœtus traités par une hormone œstrogène, l'aire mamelonnaire se soulève prématurément en formant un mamelon saillant, bien qu'il ne soit pas constitué d'invagination épidermique autour de l'ébauche mammaire (A. Raynaud, 1949 [25] et 1955 [45]) ; en outre, le développement du bourgeon mammaire est en général anormal, ou est arrêté ; il est cependant des cas (fœtus contaminés par de faibles quantités d'hormone œstrogène, par exemple) où le mamelon devient saillant, sans que l'ébauche mammaire soit inhibée ; le mode de développement de tels mamelons se rapproche beaucoup de celui de la plupart des Monodelphes (A. Raynaud, 1955 [45]).

Chez la plupart des fœtus traités par les hormones œstrogènes, les mamelons présentent en outre, assez fréquemment, de grosses malformations : parfois sur la plus grande partie de l'aire mamelonnaire, l'épiderme forme un amas épais, ou bien il est en continuité avec une invagination profondément enfoncée dans le mésenchyme sous-jacent (fig. des pl. X, XII).

En général, lorsque l'ébauche mammaire a été partiellement ou totalement inhibée, le mamelon demeure imperforé. Une des malformations du mamelon fréquemment observée dans ces expériences est représentée par la formation d'une large dépression épidermique (coelomaste), au centre de l'aire mammaire (fig. 28, pl. IX) ; cette dépression cutanée peut être minime, peu marquée, ou bien profonde, et constituer, dans ce cas, une poche à bords rapprochés ou éloignés, à ouverture extérieure large ou étroite (fig. 27, pl. VIII) ; ces cavités mammaires (coelomastes) sont tapissées par un épithélium malpighien kératinisé ; ces formations représentent à la fois une malformation de la mamelle et du mamelon (elles sont étudiées dans le paragraphe suivant) ; leur configuration correspond à une endothélie, tantôt légère,

tantôt profonde, et se rapproche de la configuration des mamelons dits « enfoncés » ou « invaginés », disposition qui a été souvent

TABLEAU VII. — Morphologie et structure (d'après l'examen histologique) des ébauches mammaires des fœtus de souris ayant reçu, à l'âge de 12 à 13 jours, une injection de dipropionate d'œstradiol.

Désignation du fœtus (n° de prélèvement.)	Âge du fœtus.	Sexe du fœtus.	Etat des ébauches mammaires pectorales. (é.g.:ébauche gauche;é.dr.:ébauche droite.)			Etat des ébauches mammaires, inguinales. é.g.:ébauche gauche;é.dr.:ébauche dr.	
			1 ^{re} paire	2 ^{me} paire	3 ^{me} paire	1 ^{re} paire	2 ^{me} paire
Foetus injecté à l'âge de 12 jours.							
1753	17 jours 10 h. ± 8 h.	♂	coelomastes avec deux petits bourgeons	é.dr.:court cordon mammaire à base épidermique. é.g.:petit cordon épidermique terminé par un amas de cellules basophiles bourgeonnant.	invaginations épidermiques terminées par un court cordon mammaire.	invaginations épidermiques avec des cellules basophiles à leur partie profonde.	é.dr.:absente. é.g.:petit amas épidermique avec cellules basophiles
Foetus injectés à l'âge de 13 jours							
1641	18 j. 18 h. ± 30.	♀	é.dr.:court bourgeon mammaire; é.g.:petit amas épidermique, avec cellules basophiles à sa partie distale.	amas (petites invaginations épidermiques ayant à leur partie distale un groupe de cellules basophiles).	é.dr.:petit mamelon dissymétrique, sans mamelle. é.g.:petit mamelon avec un minuscule reste de bourgeon mammaire.	petites invaginations épidermiques avec des cellules basophiles sur leurs bords (et bourgeonnant à la base de l'ébauche gauche).	é.dr.:mamelon avec un reste minuscule de bourgeon mammaire; é.g.:très petit reste de bourgeon mammaire à la base d'un petit épaississement épidermique.
1646	1d	♂	mamelons sans mamelle.	invaginations épidermiques avec cellules basophiles et terminées par un court cordon mammaire.	mamelons sans mamelle.	é.dr.:petit amas épidermique portant à sa partie distale, un petit bourgeon mammaire. é.g.:petit mamelon sans mamelle.	petits mamelons sans mamelle (ou avec un reste minuscule de bourgeon mammaire).
1657	18 j. 9 h. ± 8 h. 30	♀	é.dr.:coelomaste avec deux bourgeons; é.g.:très court cordon mammaire.	invaginations épidermiques cylindriques, profondes.	invaginations épidermiques terminées par un amas de cellules basophiles.	ébauches inhibées (il ne persiste qu'un petit épaississement épidermique).	mamelons sans mamelle.
1658	1d.	♀	coelomastes avec plusieurs bourgeons mammaires.	é.dr.:invagination épidermique cylindrique profonde. é.g.:coelomaste.	é.dr.:invagination épidermique avec cellules basophiles à sa base. é.g.:petite invagination épidermique avec des bourgeons à sa base.	petite coelomaste sans bourgeons	mamelons sans mamelle.
1659	1d.	♀	é.dr.:petit coelomaste avec des bourgeons rudimentaires. é.g.:petit mamelon sans mamelle.	invaginations épidermiques profondes.	invaginations épidermiques profondes.	é.dr.:petit amas (courte invagination) épidermique. é.g.:petit amas épidermique.	mamelons sans mamelle.

décrite chez la femme et chez divers animaux (comparer ces fig. 27, 29 à la fig. 22 du travail de K. Basch [5]).

Les hormones œstrogènes sont ainsi à l'origine de nombreux vices de conformation des mamelons des fœtus.

β) *Effets sur la glande mammaire.* — Nous étudierons successivement la structure des malformations mammaires provoquées

TABEAU VII (suite). — Morphologie et structure (d'après l'examen histologique) des ébauches mammaires des fœtus de souris ayant reçu, à l'âge de 12 à 13 jours, une injection de dipropionate d'œstradiol.

Désignation du fœtus. (N° de prélèvement.)	Age du fœtus.	Sexe du fœtus.	Etat des ébauches des mammaires pectorales.			Etat des ébauches mammaires inguinales.	
			1ère paire	2ème paire	3ème paire	1ère paire	2ème paire
Fœtus injectés à l'âge de 13 jours. (suite)							
1662	18 jours 9 heures ± 8 h.	♀	é.dr.: cordon mammaire rudimentaire; é.g.: formés de deux cordons mammaires à bases distinctes.	invaginations épidermiques avec une couche de cellules basophiles à leur base.	ébauches formées de deux parties: court cordon mammaire à base épidermique.	é.dr.: mamelon sans mamelle. é.g.: petit amas épidermique cœnique avec cellules basophiles.	mamelons sans mamelle.
1666	id.	♀	é.dr.: petit cœlomaste avec un court cordon mammaire, et un très petit bourgeon é.g.: petit cœlomaste avec une petite ébauche de bourgeon.	invaginations épidermiques profondes et larges.	é.dr.: invagination épidermique profonde et large. é.g.: ébauche formée de deux parties: cordon mammaire étroit et court, à base épidermique.	é.dr.: petit amas épidermique avec cellules basophiles. é.g.: minuscule reste de bourgeon mammaire, à l'apex d'un mamelon.	mamelons sans mamelle.
1680	18 jours 9 heures ± 8 h.30	♂	mamelons sans mamelle.	ébauches formées de deux parties: invaginations épidermiques prolongées par un cordon mammaire court.	cordons mammaires longs, attachés à l'épiderme; celui de gauche à base épidermique; (ébauches sub-normales.)	ébauches formées de deux parties; petites invaginations épidermiques prolongées par un cordon mammaire court.	é.dr.: mamelon sans mamelle. é.g.: cordon mammaire rudimentaire attaché à l'apex d'un mamelon.
1682	id.	♂	cordons mammaires de taille réduite attachés à l'épiderme par une base renflée.	petits cordons mammaires détachés de l'épiderme.	petits cordons mammaires détachés de l'épiderme.	petits cordons mammaires détachés de l'épiderme.	é.dr.: absente. é.g.: cordon mammaire rudimentaire attaché à l'épiderme.
1687	18 jours 9 heures ± 8 h.30	♀	mamelons sans mamelle.	invaginations épidermiques.	invaginations épidermiques (avec à gauche des cellules basophiles bourgeonnant à sa partie distale)	é.dr.: mamelon sans mamelle. é.g.: courte invagination épidermique rappelant un petit cœlomaste.	mamelons sans mamelle.
1691	18 jours 8 h.30 ± 8 h.30	♀	ébauches formées de deux cordons mammaires naissant à la base d'un épaississement de l'épiderme.	é.dr.: cordon mammaire sub-normal, à base élargie. é.g.: deux cordons mammaires à bases contigües dans un amas épidermique.	é.dr.: cordon mammaire mince et court dans l'axe d'un mamelon é.g.: d'aspect normal.	invagination épidermique (amas larges avec cellules basophiles à leur base.)	mamelons sans mamelle.

par les hormones œstrogènes, puis leur fréquence et leur répartition (les différentes malformations rencontrées chez les divers

foetus appartenant à la première série expérimentale sont rapportées dans les tableaux VII à IX).

TABLEAU VII (suite et fin). — Morphologie et structure (d'après l'examen histologique) des ébauches mammaires des fœtus de souris ayant reçu, à l'âge de 12 à 13 jours, une injection de dipropionate d'œstradiol.

Désignation du fœtus. (N° de prélèvement)	Age du fœtus	Sexe du fœtus.	Etat des ébauches mammaires pectorales.			Etat des ébauches mammaires inguinales.	
			1ère paire	2ème paire	3ème paire	1ère paire	2ème paire
Foetus injectés à l'âge de 13 jours. (Fin)							
1696	18 jours 10 h. ± 8 h.30	♂	mamelons sans mamelle.	é.dr.: court cordon mammaire attaché à l'épiderme. é.g.: mamelon sans mamelle.	é.dr.: court cordon mammaire attaché à l'épiderme. é.g.: minuscule reste de bourgeon mammaire à l'apex d'un mamelon.	mamelons sans mamelle.	mamelons sans mamelle.
1697	id.	♂	mamelons sans mamelle.	ébauches formées de deux parties: cordons mammaires courts à base épidermique.	cordons mammaires courts et étroits attachés à l'épiderme au sommet d'un mamelon.	mamelons sans mamelle	é.dr.: et é.g.: formées d'un cordon mammaire rudimentaire attaché à l'apex d'un mamelon.
1700	18 jours 14 h. ± 8 h.30	♂	mamelons sans mamelle.	mamelons sans mamelle.	mamelons sans mamelle.	mamelons sans mamelle.	mamelons sans mamelle.
1701	id.	♂	id.	id.	id.	id.	id.

1° MORPHOLOGIE ET STRUCTURE HISTOLOGIQUE DES DIVERSES MALFORMATIONS MAMMAIRES OBSERVÉES.

Les hormones œstrogènes altèrent fortement le développement foetal de la mamelle et sont à l'origine de très nombreuses malformations mammaires congénitales [41, 44]; les effets de l'hormone

PLANCHE V

Photographies (Gr. = 228) de sections médianes de mamelons de fœtus femelles de souris ayant reçu une injection d'hormone œstrogène : les mamelons se sont développés, sont devenus saillants, mais le développement de l'ébauche mammaire a été totalement arrêté; on retrouve cependant, à l'apex de ces mamelons, un petit amas cellulaire représentant un résidu du bourgeon mammaire (fig. 20).

FIG. 18. — Section du premier mamelon inguinal gauche du fœtus femelle de souris n° 1666, ayant reçu 94 γ de dipropionate d'œstradiol à l'âge de 13 jours.

FIG. 19. — Section du premier mamelon pectoral gauche du fœtus femelle de souris n° 1687, âgé de 18 jours 9 heures, ayant reçu 100 γ de dipropionate d'œstradiol à l'âge de 13 jours 12 heures ± 8 h. 30.

FIG. 20. — Section du premier mamelon pectoral gauche du fœtus femelle de souris n° 1657, âgé de 18 jours 9 heures ± 8 h. 30, ayant reçu 75 γ de dipropionate d'œstradiol à l'âge de 13 jours 11 heures ± 8 h. 30.

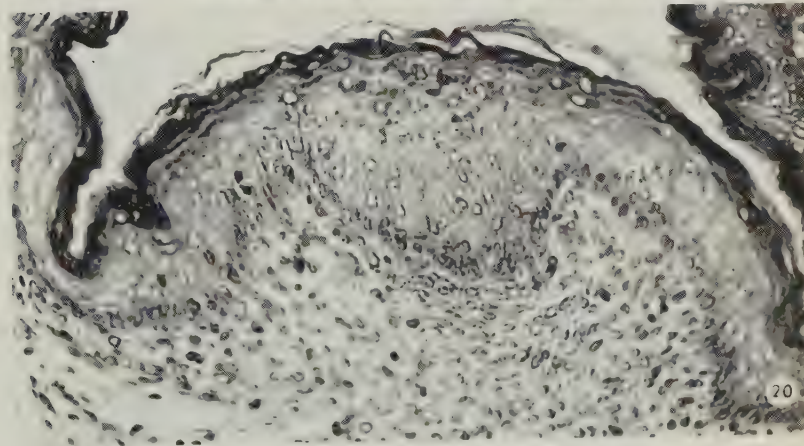
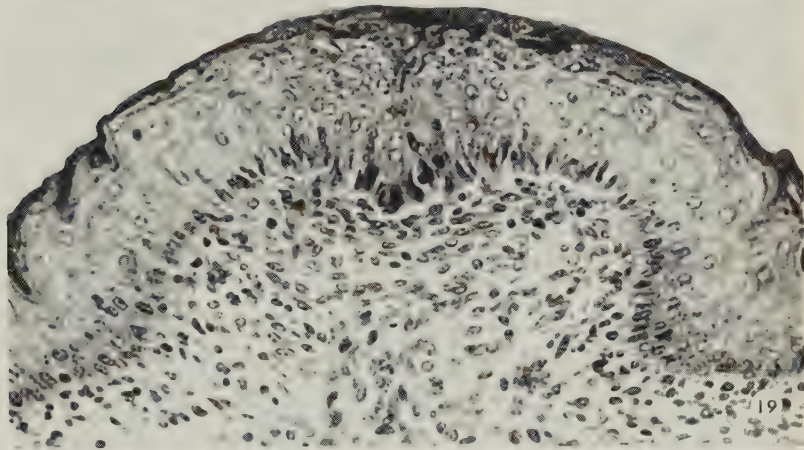
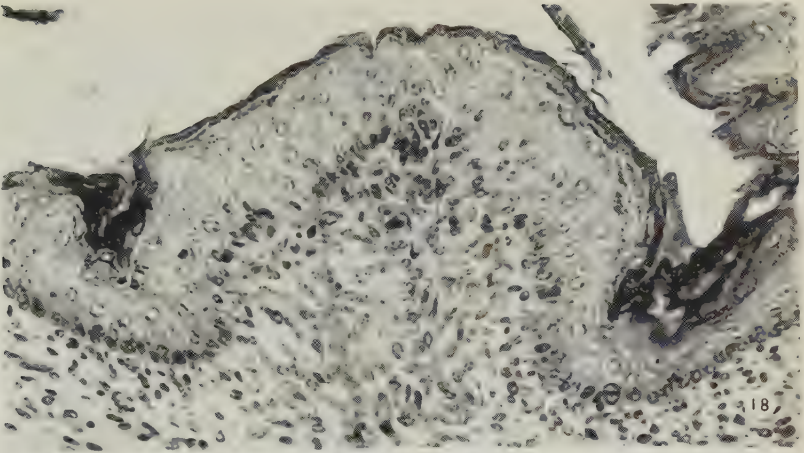


PLANCHE V.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

PLANCHE VI

FIG. 21. — Section de la deuxième ébauche mammaire inguinale gauche du fœtus femelle de souris n° 1649, âgé de 18 jours 16 heures $\pm$ 8 h. 30, pesant 1 017,8 mg ; ce fœtus avait reçu une injection de 94 γ de dipropionate d'œstradiol dans la cavité abdominale à l'âge de 14 jours 11 h. 30 $\pm$ 8 h. 30 ; le développement de l'ébauche mammaire a été arrêté (Gr. = 229).

FIG. 22. — Section de la partie basale de la deuxième ébauche mammaire inguinale gauche du fœtus femelle de souris n° 1654, âgé de 18 jours 16 heures $\pm$ 8 h. 30, pesant 749,1 mg ; ce fœtus est un fœtus témoin ; il avait reçu à l'âge de 14 jours 9 h. 30 $\pm$ 8 h. 30, une injection de 1/80 de centimètre cube d'huile d'olive dans la cavité abdominale ; la glande mammaire est bien développée (Gr. = 229).

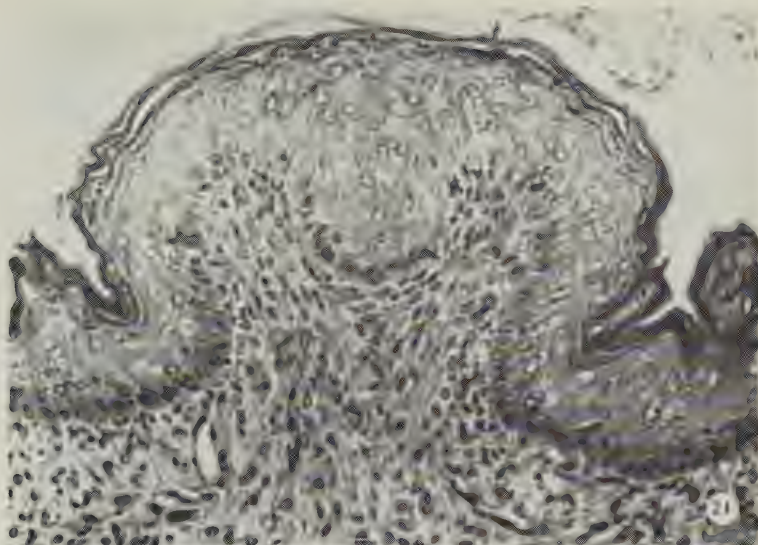


PLANCHE VI.

MAS-ON ET C^o PROPRIETAIRES

PLANCHE VII

FIG. 23. — Section de la première ébauche mammaire pectorale droite du fœtus femelle de souris, n° 1662, âgé de 18 jours 9 heures $\pm$ 8 heures, pesant 1 076 mg ; ce fœtus avait reçu, à l'âge de 13 jours 13 heures $\pm$ 8 heures, une injection de 94 γ de dipropionate d'œstradiol dans la cavité abdominale. On voit que cette ébauche pectorale a été partiellement inhibée dans son développement et qu'elle se présente à terme sous forme d'un cordon mammaire rudimentaire (Gr. = 228).

FIG. 24. — Deux sections intéressant la troisième ébauche mammaire pectorale droite du fœtus femelle de souris n° 1691, âgé de 18 jours 8 h. 30 $\pm$ 8 h. 30, pesant 1 205,7 mg, ayant reçu à l'âge de 13 jours 13 h. 30 $\pm$ 8 h. 30, 45 γ de dipropionate d'œstradiol dans le flanc droit ; l'ébauche mammaire présente à terme une forte réduction de taille (Gr. = 228).

FIG. 25. — Section histologique de la partie basale de la première ébauche mammaire pectorale gauche du fœtus femelle de souris n° 1692, âgé de 18 jours 8 h. 30 $\pm$ 8 h. 30, pesant 1 062 mg ; ce fœtus appartenait à la même portée que le fœtus n° 1691, mais il n'a pas reçu d'injection d'hormone œstrogène : l'ébauche mammaire, dont on ne voit ici que la base, est bien développée (Gr. = 231).

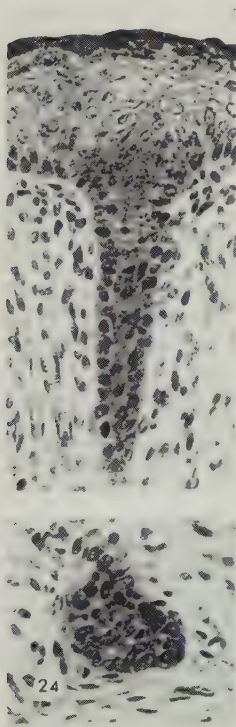
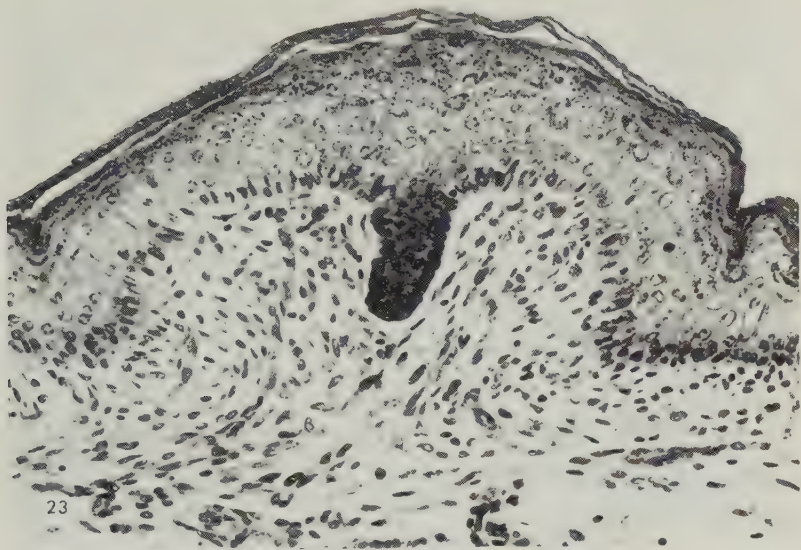


PLANCHE VII.

PLANCHE VIII

FIG. 26. — Section de la partie basale de la première ébauche mammaire pectorale droite de la souris femelle nouveau-née normale, n° 1899, âgée de 0 à 24 heures ; l'ébauche est bien développée, et, de part et d'autre du cordon mammaire, on aperçoit l'invagination épithéliale délimitant le mamelon (Gr. = 232).

FIG. 27. — Section histologique, à l'emplacement de la première ébauche mammaire pectorale gauche du fœtus femelle de souris n° 1658, âgé de 18 jours 9 heures $\pm$ 8 h. 30, pesant 1 174,5 mg ; ce fœtus avait reçu, à l'âge de 13 jours 11 heures $\pm$ 8 h. 30, une injection de 75 γ de dipropionate d'œstradiol dans la cage thoracique ; à l'emplacement de l'ébauche mammaire, on trouve, à terme, une sorte de poche cutanée (œlomaste), bordée par un épithélium malpighien desquamant abondamment ; noter l'état rudimentaire de la glande mammaire, qui est réduite à quelques bourgeons rudimentaires issus de la partie inférieure du œlomaste (Gr. = 231). Comparer aussi cette photographie à celle de l'ébauche mammaire d'un fœtus de 13 jours, représentée sur la figure 25.

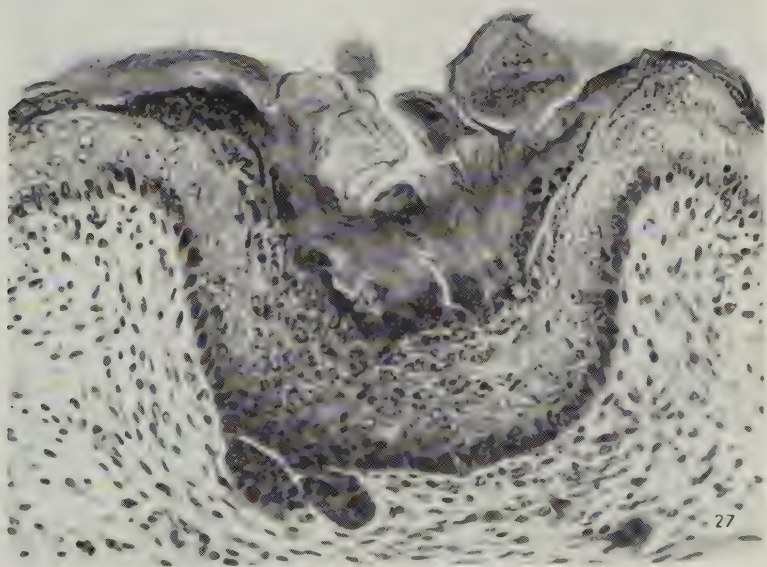
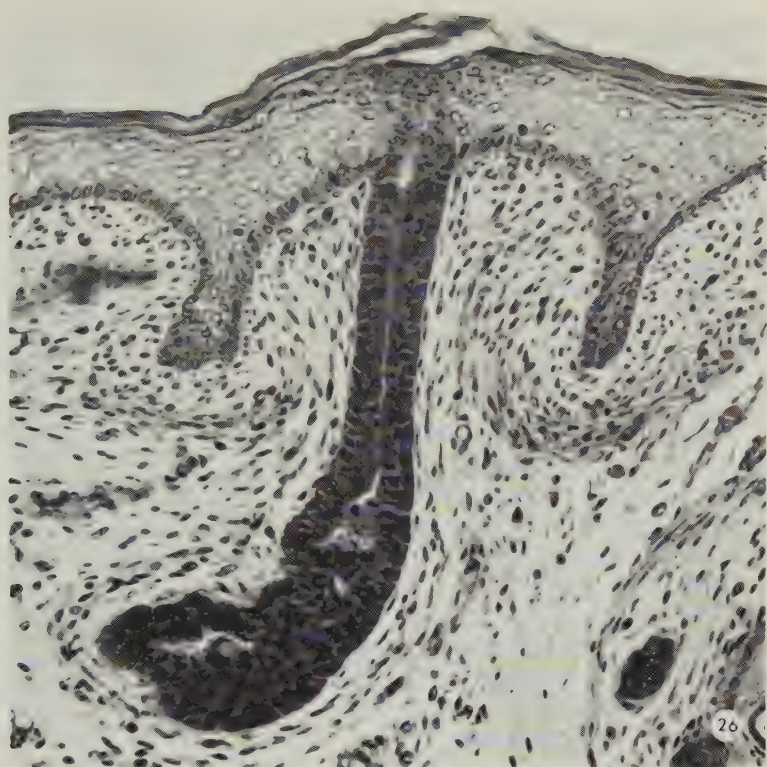


PLANCHE VIII.

varient suivant le sexe, l'âge de l'embryon au moment de l'injection, la position de l'ébauche mammaire considérée et la dose injectée.

Nous étudierons d'abord les effets du dipropionate d'œstradiol injecté à l'embryon de souris à l'âge de 12, de 13 et de 14 jours.

TABLEAU VIII. — Morphologie et structure (d'après l'examen histologique) des ébauches mammaires des fœtus de souris ayant reçu, à l'âge de 14 jours, une injection de dipropionate d'œstradiol.

Désignation du fœtus. (n° de prélèvement)	Age du fœtus	Sexe du fœtus.	Etat des ébauches mammaires pectorales (é.g.:ébauche gauche;é.dr.:ébauche droite)			Etat des ébauches mammaires inguinales. (é.g.:ébauche gauche;é.dr.:ébauche droite)	
			1ère paire	2ème paire	3ème paire	1ère paire	2ème paire
I654	18 jours 9 heures ± 9h.	♂	petits mamelons sans mamelle.	é.dr.:petite invagination épidermique avec à sa partie distale,un groupe de cellules basophiles bourgeonnant. é.g.:petite invagination épidermique.	petits amas épidermiques encastés dans l'épiderme.	é.dr.:amas épidermique conique ayant à sa base,un groupe de cellules basophiles(inhibition sub-totale) é.g.:petit amas cellulaire conique encasté dans l'épiderme	mamelons sans mamelle.
I649	18 jours 16 h. ± 8 h.30	♀	ébauches sub-normales.(épaissies et légèrement coniques à leur base.)	amas épidermiques ayant à leur base des assises de cellules basophiles d'où partent deux cordons mammaires à base contigüe	ébauches bipartites:cordons mammaires à base épidermique.	invaginations épidermiques avec des cellules basophiles dans leurs couches profondes.	é.dr.:petit amas épidermique; é.g.:petite invagination épidermique avec des assises profondes basophiles.
I652	1d.	♂	mamelons sans mamelle.	petits cordons mammaires,détachés de l'épiderme;leur base est renflée et contient un petit amas de cellules éosinophiles,probablement d'origine épidermique.	cordons mammaires séparés de l'épiderme (le droit est assez long).	petits cordons mammaires séparés de l'épiderme.	absentes. petits mamelons sans mamelle).

A ces stades, l'hormone œstrogène provoque de nombreuses malformations mammaires qui peuvent être ainsi classées :

Inhibition totale du développement du bourgeon mammaire.

Inhibition partielle du développement du bourgeon mammaire, avec ou sans modifications importantes de la morphologie du cordon mammaire primaire.

Formation, à l'emplacement des ébauches mammaires, de cavités (coelomastes), à la base desquelles existe, parfois, un rudiment d'ébauche mammaire.

Formation, à l'emplacement des ébauches mammaires, d'invaginations ectodermiques, en général cylindriques, assez profondes.

Formation d'amas épithéliaux, sans morphologie définie, pré-

sentant à leur partie inférieure, ou sur leur paroi, des restes d'éléments du bourgeon mammaire, donnant naissance à des ébauches réduites ou anormales.

Modifications spéciales correspondant à une transformation du mode spécifique de la morphogénèse mammaire : ce sont les ébauches à bourgeons multiples ou à deux cordons mammaires, ou celles chez lesquelles un cône épidermique existe chez les fœtus à terme.

Hyperdéveloppement du mésenchyme autour du bourgeon mammaire.

Nous allons étudier successivement ces grandes catégories de malformations.

Inhibition totale du développement du bourgeon mammaire.

Les figures 17, planche IV, 18, 19 et 20, planche V, et 21, planche VI, montrent des sections médianes de l'aire mammaire chez des fœtus femelles de souris âgés de 18 jours et quelques heures, ayant reçu une injection de 75 à 150 γ de dipropionate d'œstradiol à l'âge de 13 ou 14 jours ; on voit sur ces sections, que le développement du bourgeon mammaire a été totalement inhibé : au lieu du long cordon épithélial inséré dans l'épiderme, qui représente une ébauche mammaire normale (voir les fig. 7, pl. I, et 12, 13, 14, 15, 16, pl. IV), on ne trouve, à l'emplacement où devrait se trouver l'ébauche, que quelques cellules (parfois un petit groupe) représentant le résidu du bourgeon mammaire ; l'huile d'olive, qui sert de solvant à l'hormone, n'est pas en cause dans ce phénomène d'inhibition : il n'y a pour s'en convaincre, qu'à comparer les figures 22 et 21 de la planche VI ; la figure 22 représente une section de la deuxième ébauche mammaire inguinale gauche (toute l'ébauche n'apparaît pas sur cette section) d'un fœtus femelle de souris (fœtus n° 1654) âgé de 18 jours 16 heures $\pm$ 8 h. 30, pesant 749,1 mg, ayant reçu une injection intra-abdominale de 1/120 de centimètre cube d'huile d'olive pure, à l'âge de 14 jours 9 h. 30 $\pm$ 8 h. 30 ; l'ébauche mammaire est bien développée et sa structure est normale ; la figure 21 représente une section médiane à l'emplacement de la deuxième ébauche mammaire inguinale gauche d'un fœtus femelle de souris (fœtus n° 1649), âgé de 18 jours 16 heures $\pm$ 8 h. 30, pesant 1 017,8 mg, ayant reçu une injection intra-abdominale de 1/160 de centimètre cube de la solution d'hormone œstrogène (93,7 γ de dipropionate d'œstradiol) à l'âge de 14 jours 11 h. 30 $\pm$ 8 h. 30 ; à l'emplacement où devrait se trouver l'ébauche mammaire il n'y a qu'un petit amas de cellules épidermiques bordé inférieurement par une assise de cellules basophiles ; le développement du bourgeon mammaire a été totalement arrêté. De même les figures 12 et 13 de la planche IV, qui représentent deux sections de la

première ébauche mammaire inguinale droite d'un fœtus femelle âgé de 17 jours, ayant reçu 1/80 de centimètre cube d'huile d'olive dans sa cavité amniotique à l'âge de 12 jours et quelques heures, montre que l'huile n'a pas entravé le développement fœtal de la mamelle.

La morphologie de ces aires mammaires ainsi modifiées est variable :

En général, il s'est formé un mamelon saillant, dépourvu d'ébauche mammaire : une section médiane de ces mamelons montre la saillie dermique recouverte par un épiderme épaissi ; le bourgeon mammaire fait défaut ; mais dans les assises basales de l'épiderme du sommet du mamelon, on aperçoit des cellules à noyau un peu plus gros et un peu moins colorés que les noyaux de la couche germinative de l'épiderme environnant (fig. 17, pl. IV) ; ces cellules représentent vraisemblablement les restes du matériel du bourgeon mammaire primaire ; parfois il persiste un petit résidu du bourgeon mammaire, constitué par un groupe de cellules à noyau fortement coloré, formant un minuscule bourgeon appendu à l'apex du mamelon (fig. 18, pl. V), ou formant une petite saillie, dirigée vers l'intérieur, sur les assises basales de l'épiderme de l'apex du mamelon (fig. 19, pl. V).

L'aspect de l'inhibition est parfois différent : il ne s'est pas formé de mamelon, ou seulement un mamelon peu saillant et, au centre de l'aire mammaire, encastré dans l'épiderme, on trouve un petit amas cellulaire (fig. 20, pl. V), souvent conique ou trapézoïdal, mesurant 100 à 150 μ de profondeur (de la surface externe de l'épiderme, à la base de l'amas) et 100 à 150 μ de diamètre ; cet amas cellulaire est formé d'un épithélium malpighien (fig. 20, pl. V, et 21, pl. VI), mais dans sa couche basale, on distingue des noyaux plus petits, riches en petits blocs de chromatine ; ils diffèrent, par leur forme ovoïde ou sphérique et par leur structure nucléaire, des noyaux allongés, régulièrement disposés perpendiculairement à la basale, de la couche germinative de l'épiderme adjacent ; les mitoses sont rares ou absentes dans ces résidus cellulaires du bourgeon mammaire. Au-dessous de ces petits amas malpighiens, le mésenchyme est, en général, modifié (fig. 20, pl. V) : les noyaux de ses cellules sont globuleux, leur suc nucléaire est plus clair et l'on observe une tendance à la margination de la chromatine. Parfois, l'amas cellulaire malpighien est un peu plus important, un peu plus enfoncé dans le mésenchyme sous-jacent et ses cellules basales sont basophiles. Dans tous ces cas, le bourgeon mammaire a disparu presque complètement, il n'en persiste que quelques cellules ; le contraste est saisissant entre ces ébauches inhibées et le long cordon épithélial qui représente l'ébauche mammaire des fœtus femelles normaux ou témoins (comparer les fig. 17 à 21 des pl. IV, V et

VI, à la fig. 7 de la pl. I, aux fig. 12 à 16, pl. IV, à la fig. 22, pl. V, et à la fig. 26 de la pl. VIII).

Il est d'autres cas où le bourgeon mammaire a disparu en tant que tel, car il a subi, semble-t-il, une transformation profonde ; nous examinerons ces cas dans un paragraphe ultérieur.

*Inhibition partielle
du développement du bourgeon mammaire.*

Les figures 23 et 24 de la planche VII reproduisent une section de la totalité de la première ébauche mammaire pectorale droite du fœtus femelle n° 1662 (fig. 23) et de la troisième ébauche mammaire pectorale droite du fœtus femelle n° 1691 (fig. 24) ; elles montrent deux cas d'inhibition partielle du développement du bourgeon mammaire : appendu à l'apex du mamelon, on trouve un petit cordon cellulaire, court et formé de cellules fortement basophiles, très serrées les unes contre les autres ; la longueur de ces ébauches est variable : 50 à 100 μ pour les ébauches fortement inhibées (c'est le cas de l'ébauche représentée sur la figure 23 : le cordon mammaire rudimentaire mesure 85 μ de longueur et 30 à 40 μ de diamètre) ; lorsque l'inhibition est moins accentuée, la longueur de l'ébauche peut atteindre 250 à 350 μ (l'ébauche reproduite sur la figure 24 atteint 340 μ de longueur) ; les mitoses sont très rares ou absentes dans les ébauches moyennement inhibées.

Rappelons, pour permettre la comparaison, que la longueur normale d'une ébauche chez un fœtus femelle témoin ou normal, âgé de 18 jours, varie de 450 à 700 μ pour les ébauches inguinales et de 700 à 1 100 μ en moyenne pour les ébauches pectorales ; et ces ébauches normales sont, en général, très ramifiées.

*Formation, à l'emplacement des ébauches mammaires,
de cavités cutanées,
tapissées par un épithélium malpighien kératinisé épais.*

Le soulèvement des mamelons et l'inhibition du développement de la mamelle, sous l'effet œstrogène, avaient été observés respectivement en 1938 et 1947 ; c'est en 1952 que l'un de nous, étudiant l'effet des injections directes d'hormone œstrogène à l'embryon de souris [41], eut la surprise de constater qu'à l'emplacement de certaines ébauches mammaires il se constituait des formations curieuses, consistant en de véritables poches cutanées tapissées par un épithélium malpighien kératinisé épais, et ouvertes à l'extérieur par un orifice large ou étroit ; dans ces formations on ne trouve plus trace de mamelle, ou bien elle est réduite à des rudiments situés à la base de ces poches ; sur les sections histologiques, ces formations (fig. 27 à 29, pl. VIII et

IX) présentent la forme d'une cavité en cupule, en demi-sphère, ou en U, ouverte à l'extérieur et dont la paroi, en continuité avec l'épiderme cutané, est constituée par un épithélium malpighien kératinisé épais, identique à l'épithélium qui recouvre les mamelons des fœtus traités par l'œstrogène. Ces formations sont plus ou moins enfoncées dans le derme ; leur paroi épithéliale, épaisse, présente en général des assises basales formées de cellules basophiles ; au-dessus d'elles, on trouve une couche malpighienne avec de gros noyaux clairs et, à la partie supérieure, des cellules aplaties kératinisées ; les grains d'éléidine sont particulièrement nombreux et parfois très gros dans les assises cellulaires supérieures de cet épithélium et la desquamation des cellules cornées est très abondante : leurs débris s'accumulent dans la lumière de la cavité.

Au lieu de la configuration simple que nous venons de décrire, certaines de ces poches cutanées présentent une structure double (fig. 27, pl. VIII) : des assises cellulaires situées à la base de la paroi épithéliale qui forme le fond de la poche, naissent un ou plusieurs bourgeons constitués de cellules basophiles et représentant des ébauches de cordons mammaires multiples ; leur base est tantôt contiguë, tantôt largement séparée, mais elle est toujours issue des assises basophiles de la paroi profonde de la poche ; c'est là un indice que ces cellules basophiles représentent le reste du matériel cellulaire du bourgeon mammaire.

A ces cavités mammaires, de structure simple ou double, nous avons donné [44] le nom de *cœlomastes* (du grec *χολωμα* : cavité, et *μαστός* : mamelle).

Les dimensions de ces *cœlomastes* sont variables, la profondeur de la cavité et la largeur de l'ouverture diffèrent assez largement d'un animal à l'autre. A titre d'exemples, voici quelques chiffres : le *cœlomaste* formé à l'emplacement de la première ébauche mammaire pectorale droite du fœtus n° 1666 ne mesure que 190 μ de profondeur, tandis que son diamètre, au niveau de l'ouverture externe, atteint 250 μ . Les dimensions les plus fréquentes des *cœlomastes* sont de 230 à 250 μ pour la profondeur et de 150 $\times$ 260 μ pour deux diamètres rectangulaires au niveau de l'ouverture ; ainsi, ces deux diamètres, mesurés selon deux directions rectangulaires, au niveau de l'ouverture, sont égaux à 140 et 250 μ pour le *cœlomaste* formé à l'emplacement de la première ébauche mammaire pectorale gauche du fœtus n° 1658 (fig. 27) et à 150 et 275 μ pour le *cœlomaste* formé à l'emplacement de la première ébauche mammaire pectorale droite du fœtus n° 1657 (fig. 28) ; l'ouverture externe des *cœlomastes* n'est donc pas régulière, elle a plutôt une forme ellipsoïdale que circulaire. Quand un *cœlomaste* se forme à l'emplacement de la II^e paire d'ébauches pectorales, il est en général plus étroit et plus pro-

fond : ainsi, le cœlomaste formé au niveau de la deuxième ébauche mammaire pectorale gauche du fœtus n° 1658 atteint 275 μ de profondeur et seulement 150 μ de diamètre (fig. 29, pl. IX) et son ouverture est étroite (70 μ seulement).

L'épithélium malpighien kératinisé formant la paroi de ces cœlomastes est épaissi dans le fond de ces poches ; il atteint là fréquemment 90 μ d'épaisseur, alors que l'épaisseur de l'épiderme cutané voisin est de 45 μ en moyenne (chiffres extrêmes : 30 à 60 μ).

Quant aux bourgeons mammaires nés des assises basophiles de la paroi du fond des cœlomastes, leur longueur est variable : tantôt rudimentaires (une vingtaine de μ), ils peuvent atteindre une soixantaine de μ .

Les cœlomastes se rencontrent surtout à l'emplacement de la I^{re} paire d'ébauches mammaires pectorales ; parfois ils existent aussi à l'emplacement de la II^e paire pectorale et quelquefois, mais plus rarement, à l'emplacement de la I^{re} paire d'ébauches inguinales ; ils s'observent surtout chez les fœtus injectés précocement, à l'âge de 12 ou de 13 jours ; leur fréquence et leur répartition sont indiquées dans le tableau X ; ils représentent, en somme, un cas de transformation double d'une ébauche mammaire : il y a eu, à la fois, inhibition totale ou subtotal (bourgeons rudimentaires) du bourgeon mammaire primaire et formation de la poche à partir des constituants épidermiques supérieurs (sus-jacents au bourgeon mammaire primaire) de l'ébauche ; ils correspondent donc à une malformation de la mamelle et du mamelon.

*Formation, à l'emplacement des ébauches mammaires,
d'invaginations ectodermiques cordonales.*

Ces formations sont les plus fréquentes que l'on rencontre chez les fœtus femelles traités par les œstrogènes : à la place du bourgeon mammaire, on trouve (fig. 30 à 33, pl. X et XI) une invagination épithéliale malpighienne, de forme en général cordonale, qui s'enfonce profondément dans le mésenchyme sous-jacent ; ces invaginations diffèrent des cœlomastes en ce qu'elles sont presque toujours plus étroites, plus longues et qu'elles sont pleines au lieu d'être creuses ; il existe cependant, chez un certain nombre d'entre elles, une dépression ou une ouverture à leur partie supérieure et, par là, ces formations se rapprochent des cœlomastes étroits que nous avons décrits ci-dessus ; ceci tient au fait que cœlomastes et invaginations ont une certaine parenté d'origine.

Les figures des planches X à XII représentent quelques types de ces invaginations épithéliales ; ce sont des photographies de sections histologiques de leur partie médiane.

Le type le plus fréquent d'invagination est constitué par des invaginations cordonales, à peu près cylindriques ; les sections histologiques (fig. 30 et 31, pl. X) montrent la structure de ces invaginations : à l'emplacement où était situé, auparavant, le bourgeon mammaire, on trouve, chez les fœtus à terme (âgés de 18 jours et quelques heures), un cordon cellulaire à peu près cylindrique qui s'enfonce profondément dans le mésenchyme ; sa partie distale est le plus souvent régulièrement courbe, parfois bilobée ou déprimée ; autour d'elle, le mésenchyme est modifié, ses noyaux sont en général gonflés et orientés parallèlement à la paroi ; ces invaginations sont constituées d'un épithélium de type malpighien, avec de gros noyaux clairs, ovoïdes ou sphériques, un cytoplasme éosinophile ; les assises basales sont formées de cellules basophiles ; au niveau où ces invaginations se relient à la surface cutanée, elles présentent en leur centre une dépression ou un véritable creux ; là, les cellules épithéliales présentent de très nombreux grains d'éléidine et les plus superficielles sont kératinisées et desquament abondamment ; ces invaginations sont en continuité avec l'épithélium qui recouvre l'aire mammaire. Ces invaginations, en général bien cylindriques, peuvent présenter quelques variations de forme : leur base est parfois élargie, renflée, leur corps peut être aminci ; plus rarement elles sont irrégulières, s'amincissent à leur extrémité distale en présentant un léger aplatissement sur leurs bords (3).

Ces invaginations épithéliales cylindriques ont des dimensions assez constantes : ainsi chez le fœtus femelle n° 1657, qui a reçu 75 γ de dipropionate d'œstradiol dans sa cavité abdominale (la pointe de l'aiguille a été enfoncée un peu au-dessus de la base de la patte postérieure gauche, juste en arrière du foie), les deux invaginations épithéliales formées à l'emplacement de la II^e paire d'ébauches mammaires pectorales mesurent respectivement 250 μ et 265 μ de profondeur et 140 et 135 μ de diamètre. Chez le fœtus femelle n° 1659, de la même portée, qui a reçu 150 γ de dipropionate d'œstradiol, les quatre ébauches mammaires des II^e et III^e paires pectorales sont transformées en invaginations épithéliales cylindriques : leur longueur (profondeur) est comprise entre 200 et 275 μ ; elles sont un peu plus étroites que chez le fœtus précédent : le diamètre de l'une d'entre elles est de 75 μ ; il est de 100 μ chez deux autres et de 125 μ chez la quatrième ; deux de ces invaginations sont représentées sur les figures 30 et 31, planche X. Chez le fœtus femelle n° 1658 de la même

(3) Dans les tableaux VII et VIII, ces invaginations formées d'un épithélium malpighien d'origine ectodermique sont désignées simplement par les termes d' « invagination épidermique » ; de même, la dénomination « amas épidermique » est utilisée pour désigner les amas épithéliaux malpighiens, d'origine ectodermique.

portée, qui a reçu 75 γ de dipropionate d'œstradiol (piqûre dans la partie dorsale du flanc droit, injection localisée dans la cage thoracique au-dessus du diaphragme), une invagination pectorale droite atteint 320 μ de longueur (profondeur) et 150 μ de diamètre.

Ces invaginations cylindriques profondes s'observent à l'emplacement des II^e et III^e paires d'ébauches mammaires pectorales.

Quelques-unes de ces invaginations présentent une morphologie particulière :

C'est le cas du fœtus n° 1666 âgé de 18 jours et quelques heures, pesant 773 mg, ayant reçu à l'âge de 13 jours, 94 γ de dipropionate d'œstradiol dans sa cage thoracique [pénétration de la pointe de l'aiguille dans le flanc droit de l'embryon, un peu en avant (cranialement) de la patte postérieure droite et un peu en arrière (dorsalement) du foie] ; à l'emplacement de la II^e paire d'ébauches pectorales et de la troisième ébauche pectorale droite de ce fœtus existent des invaginations épithéliales profondes et massives, formées d'un épithélium malpighien kératinisé en surface ; au niveau de la II^e paire, ces invaginations s'ouvrent à l'extérieur par une ouverture conique ; leur partie proximale est cylindrique et creusée d'une lumière nette, bordée de strates kératinisées ; leur partie distale est formée d'un amas cellulaire de type malpighien, de forme cylindrique (175 μ de diamètre) ou de section elliptique, ne présentant qu'une minuscule lumière ou pas de lumière ; la longueur totale de ces invaginations atteint environ 400 μ ; sur les sections obliques, cette partie distale se présente (fig. 35, pl. XI) sous forme d'un amas malpighien de section circulaire ou elliptique, plongé dans le mésenchyme sous-

PLANCHE IX

FIG. 28. — Section histologique à l'emplacement de la première ébauche mammaire pectorale droite du fœtus femelle de souris n° 1657, âgé de 18 jours 9 heures $\pm$ 8 h. 30, pesant 1 087,4 mg ; ce fœtus avait reçu à l'âge de 13 jours 11 heures $\pm$ 8 h. 30, une injection de 75 γ de dipropionate d'œstradiol dans la cavité abdominale. A l'emplacement de l'ébauche mammaire, il s'est constitué une large poche cutanée (coelomaste), bordée par un épithélium malpighien, dont les cellules cornées desquamées s'accumulent dans la cavité du coelomaste ; la glande mammaire est presque totalement absente (Gr. = 228).

FIG. 29. — Section histologique effectuée à l'emplacement de la deuxième ébauche mammaire pectorale gauche du fœtus femelle de souris n° 1658, âgé de 18 jours 9 heures $\pm$ 8 h. 30, pesant 1 174,5 mg ; ce fœtus avait reçu 75 γ de dipropionate d'œstradiol dans la cage thoracique à l'âge de 13 jours 11 heures $\pm$ 8 h. 30. A l'emplacement de cette ébauche mammaire, il s'est constitué une poche cutanée profonde (coelomaste), plus étroite que celle représentée sur la figure 27. Noter ici l'absence totale de mamelle et la desquamation abondante à l'intérieur du coelomaste (Gr. = 228). Comparer ces deux photographies à celle représentant l'ébauche mammaire d'un fœtus témoin (fig. 25).

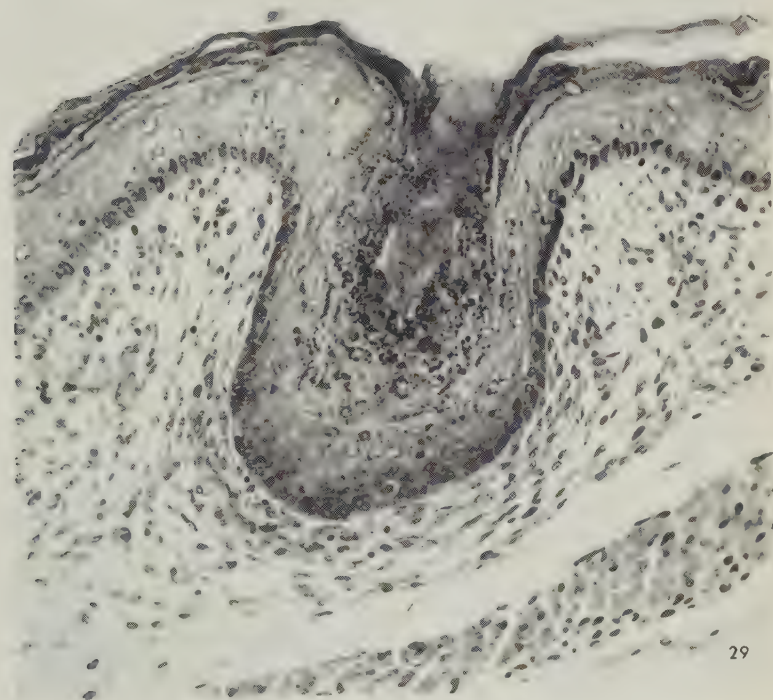
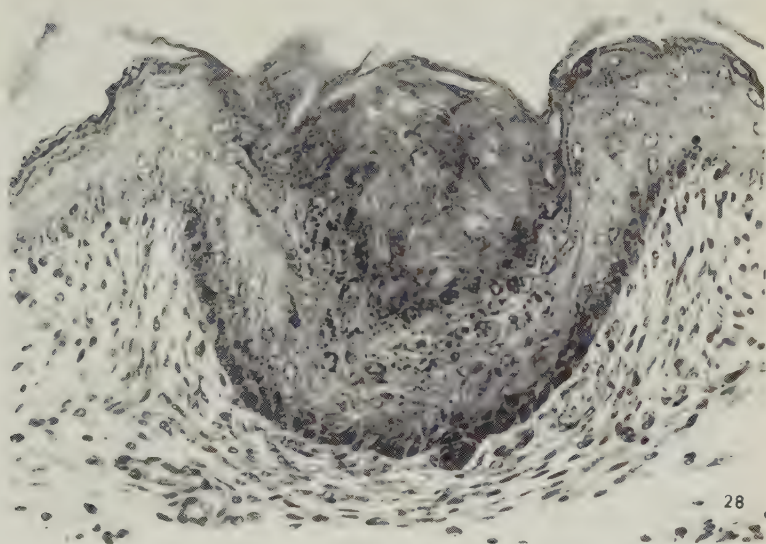


PLANCHE IX.

PLANCHE XI

FIG. 32. — Section histologique à l'emplacement de la deuxième ébauche mammaire pectorale droite du fœtus femelle de souris n° 1662, âgé de 18 jours 9 heures $\pm$ 8 heures, pesant 1 076 mg ; ce fœtus a reçu, à l'âge de 13 jours 13 heures $\pm$ 8 heures, une injection de 94 γ de dipropionate d'œstradiol, dans la cavité abdominale. A l'emplacement de cette ébauche mammaire, on trouve un amas de cellules épithéliales de type malpighien entourées de quelques cellules fortement basophiles, qui représentent très vraisemblablement le matériel cellulaire du bourgeon mammaire qui a été étalé à la suite de la croissance de la masse interne de cellules malpighiennes (Gr. = 231).

FIG. 33. — Section d'une invagination épithéliale malpighienne formée à l'emplacement d'une ébauche mammaire pectorale droite du fœtus femelle de souris n° 1658, âgé de 18 jours 9 heures $\pm$ 8 h. 30, pesant 1174,5 mg et ayant reçu 75 γ de dipropionate d'œstradiol dans la cage thoracique à l'âge de 13 jours 11 heures $\pm$ 8 h. 30. On aperçoit un début de kératinisation dans l'invagination.

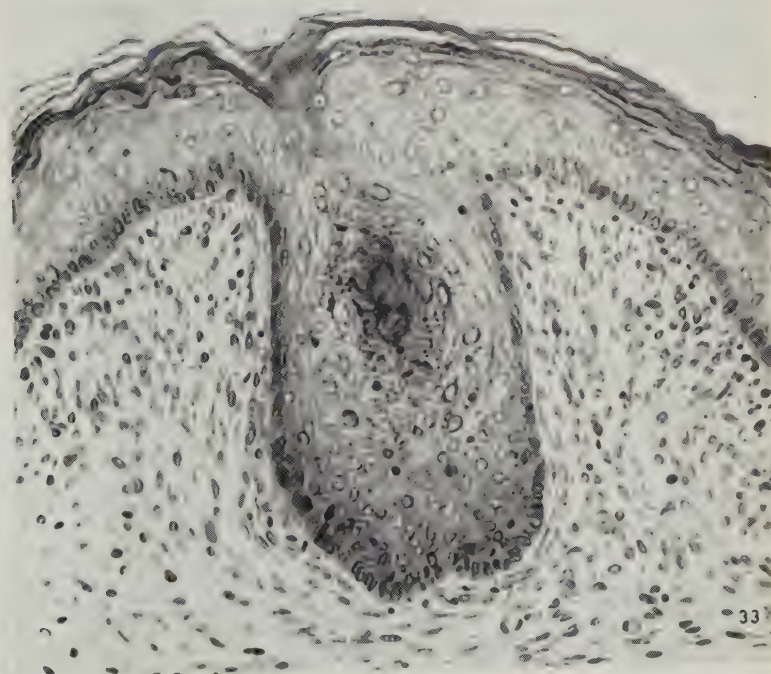
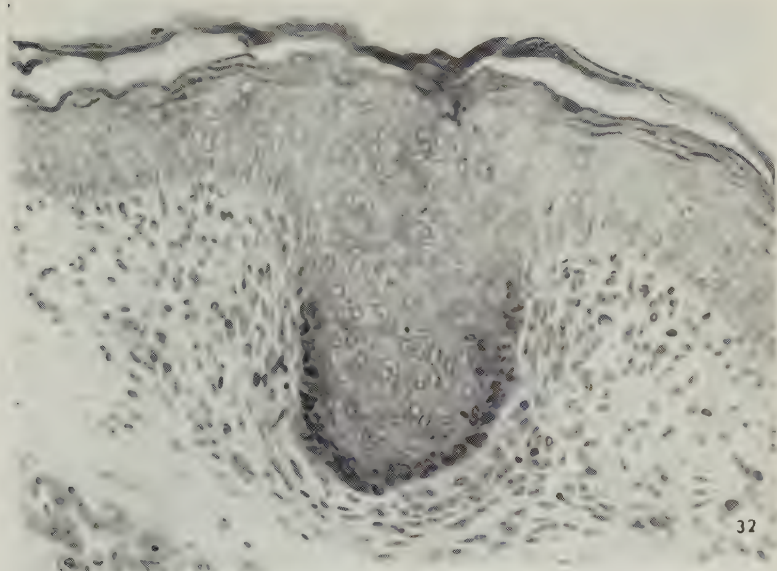


PLANCHE XI.

PLANCHE XII

FIG. 34 et 35. — Deux sections histologiques de la partie basale (fig. 34) et de l'extrémité distale (fig. 35) de l'invagination épithéliale malpighienne, formée à l'emplacement de la deuxième ébauche mammaire pectorale droite du fœtus femelle de souris n° 1666 ; ce fœtus avait reçu 94 γ de dipropionate d'œstradiol dans la cage thoracique, à l'âge de 13 jours 13 heures $\pm$ 8 heures ; il a été sacrifié à l'âge de 18 jours 9 heures $\pm$ 8 heures ; il pesait alors 773 mg. L'invagination épithéliale formée à l'emplacement de cette ébauche mammaire s'ouvre à l'extérieur par un canal à parois kératinisées ; son extrémité distale est renflée, pleine, mais, dans sa partie centrale, les cellules présentent déjà des grains d'éléidine, laissant présager une kératinisation prochaine ; il est possible que de telles structures conduisent chez l'adulte à la formation de kystes épidermiques (Gr = 228).

FIG. 36. — Section histologique à l'emplacement de la troisième ébauche mammaire pectorale droite du fœtus femelle de souris n° 1666 ; il s'est constitué à l'emplacement de cette ébauche une invagination épithéliale malpighienne massive. On distingue, à sa partie distale, la limite entre l'épithélium malpighien et des cellules basophiles qui doivent représenter le reste des cellules du bourgeon mammaire (Gr. = 228).

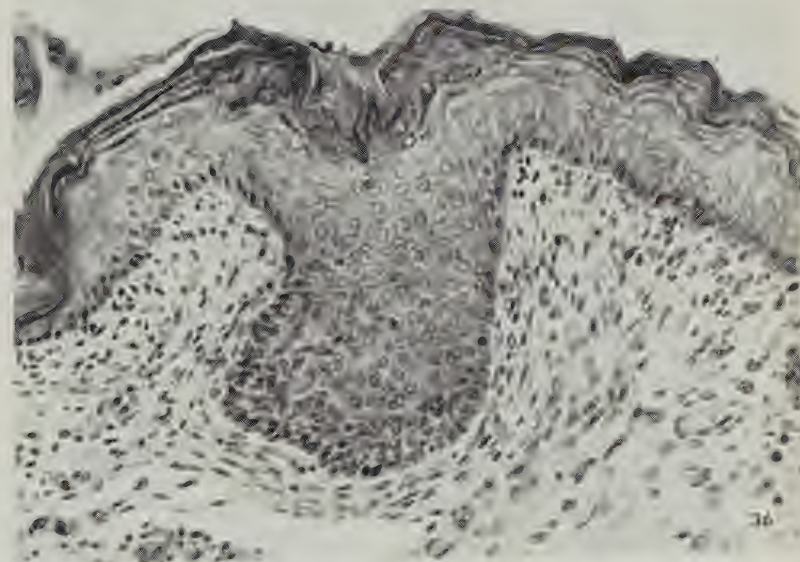
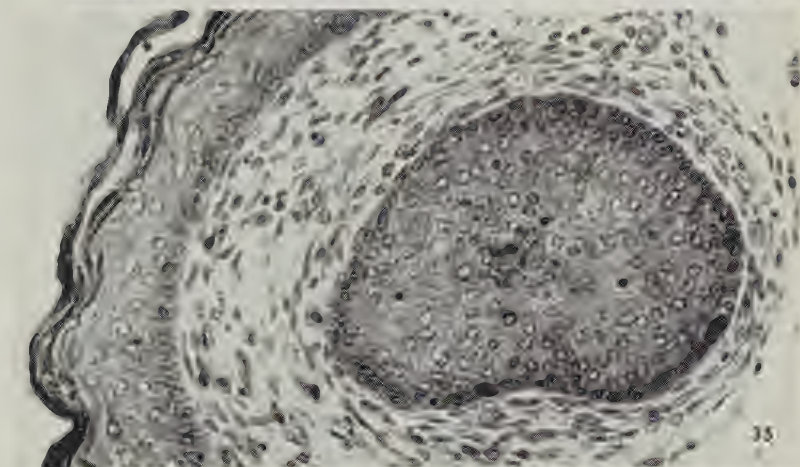
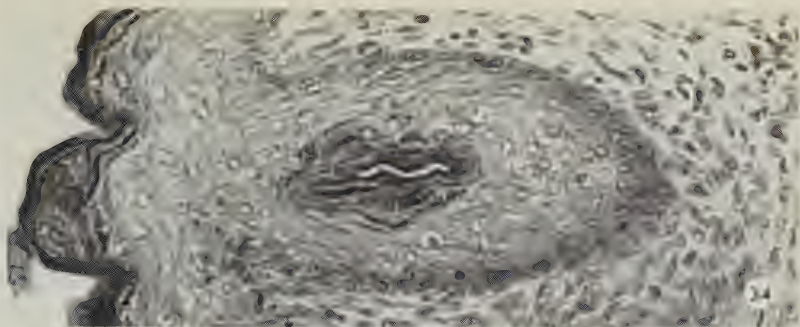


PLANCHE XII.

cutané ; cette formation rappelle un peu les premiers stades de formation d'un kyste épidermoïde.

À l'emplacement de la troisième ébauche pectorale droite de ce fœtus n° 1666, on trouve une invagination épithéliale atteignant 250 μ de longueur et 130 à 140 μ de diamètre ; elle présente une dépression, en forme d'ouverture, à sa partie superficielle ; cette invagination (fig. 36, pl. XII) est formée sur presque toute sa longueur, par un épithélium de type malpighien, kératinisé en surface ; mais, à la partie distale de l'invagination, on trouve un mince amas de petites cellules basophiles enveloppant, en quelque sorte, l'extrémité distale de l'amas malpighien ; entre ces deux sortes d'épithélium, existent des plages claires contenant des petits débris qui paraissent représenter des débris nucléaires ; cette structure histologique conduit à l'interprétation suivante : la partie malpighienne de l'invagination correspondrait à une invagination épidermique (résultant de la prolifération de la tige épidermique de l'ébauche mammaire du fœtus) ayant refoulé devant elle le bourgeon mammaire proprement dit ; en s'hypertrophiant, la partie malpighienne aurait provoqué, à sa partie distale, l'étalement du bourgeon mammaire et la destruction d'une partie de ses cellules.

Dans la plupart des invaginations, on trouve, sur leurs bords, ou à leur partie distale, des cellules basophiles à petit noyau ovoïde fortement coloré (voir les fig. 30 à 35 par exemple) représentant vraisemblablement des éléments cellulaires du bourgeon mammaire ; comme dans le cas précédent, il semble que ces éléments aient été amenés en cette position par suite d'un étalement du bourgeon mammaire, étalement provoqué par la prolifération de la partie centrale, malpighienne, de l'invagination : la figure 32 de la planche X, représentant une section médiane de l'invagination formée à l'emplacement de la deuxième ébauche mammaire pectorale droite du fœtus n° 1662, suggère bien cette interprétation ; d'ailleurs, parfois, des assises basophiles profondes de l'invagination, naissent un ou deux courts bourgeons, ou un petit cordon, tout à fait semblable à des ébauches de cordon mammaire primaire.

III

*Formation d'amas épithéliaux malpighiens,
sans morphologie définie, présentant, ou non, à leur base,
des restes de bourgeon mammaire.*

Ces amas épithéliaux malpighiens sont voisins des formations que nous avons décrites dans le paragraphe précédent. Ils se distinguent des invaginations proprement dites, car ils restent plus localisés près de la surface cutanée ; ils sont plus courts, plus massifs, et leur forme est très variable ; les cellules qui les constituent ont un gros noyau clair et sont identiques à celles

de l'épithélium qui recouvre l'aire mammaire ; en général, à la face profonde de ces formations, on trouve des assises cellulaires basophiles semblables à des cellules mammaires ; il est probable qu'elles représentent le reste du matériel cellulaire du bourgeon mammaire, car elles donnent parfois naissance à un ou à plusieurs bourgeons mammaires.

Les figures 37 et 38, planche XIII, attirent l'attention sur la morphologie particulière que présentent certains de ces amas : elles représentent une section médiane des amas malpighiens formés à l'emplacement de la 1^{re} paire d'ébauches mammaires inguinales du fœtus femelle n° 1659 ; la forme de ces amas rappelle celle d'un bourgeon mammaire primaire ; en particulier, la figure 36 (1^{re} ébauche inguinale droite) rappelle un bourgeon mammaire d'un embryon femelle âgé de 14 à 15 jours et ses dimensions (175 μ de profondeur, 130 μ de diamètre) sont voisines de celles d'une ébauche inguinale d'un fœtus femelle âgé de 15 jours ; il semble que l'ébauche ait été comme figée à ce stade de développement ; toutefois la photographie montre que toute sa partie interne est formée de cellules malpighiennes semblables à celles de l'épithélium recouvrant l'aire mammaire ; par contre, les cellules des deux ou trois couches basales sont fortement teintées par l'hémalum ; mais on ne distingue pas de limite entre ces deux types de cellules ; ces images suggèrent que, sous l'influence œstrogène, les cellules du col épidermique ont proliféré et envahi le bourgeon mammaire, dont les éléments basophiles ont été refoulés et étalés à la périphérie de l'amas cellulaire malpighien ; et de plus, la prolifération des cellules mammaires proprement dites a été arrêtée. Ces amas épithéliaux sont souvent entourés d'assises mésenchymateuses denses, à noyau globuleux turgescent, que l'on peut qualifier d'activés, par contraste avec les petits noyaux quiescents du mésenchyme lâche, banal, voisin.

Les amas malpighiens de ce type se sont formés, en général, au niveau de la 1^{re} paire d'ébauches mammaires inguinales ; ils s'observent parfois, mais moins fréquemment, au niveau de la II^e et de la III^e paire pectorale.

Etant donné que ces amas épithéliaux malpighiens présentent une origine semblable à celle des invaginations, dont ils ne constituent qu'une variété, nous les avons classés, dans le tableau récapitulatif X, dans le groupe des invaginations épidermiques.

Formation d'ébauches constituées de deux parties, ayant une base épidermique prolongée par un cordon mammaire.

Cette catégorie de malformations représente un cas particulier des précédentes et une forme intermédiaire entre celles-ci et la structure normale : l'invagination épidermique a été de faible amplitude et le bourgeon mammaire s'est développé en un cordon

mammaire plus ou moins long ; il en résulte la formation d'une ébauche à deux constituants : une base épidermique de forme en général cylindrique, qui se prolonge par un véritable cordon mammaire plus ou moins développé ; les figures 39 et 40, planche XIV, illustrent cette configuration.

Cette structure s'observe assez fréquemment au niveau de la III^e paire pectorale d'ébauches mammaires.

*Transformation du plan spécifique de structure
de l'ébauche mammaire.*

Ainsi que nous l'avons indiqué dans le chapitre II de ce travail, chez la souris, comme chez divers *muridés*, le bourgeon mammaire primaire ne donne naissance qu'à un seul cordon mammaire primaire ; c'est là une caractéristique de la morphogénèse mammaire fœtale de ces rongeurs et nous n'avons jamais observé d'exception à cette règle ; ainsi chez l'adulte, la glande mammaire débouchera à l'extérieur, à la surface de la peau, par un seul canal galactophore.

Or, plusieurs des modifications provoquées par les hormones œstrogènes correspondent à une transformation du mode spécifique de cette morphogénèse ; ces phénomènes feront l'objet d'une description détaillée dans un autre travail ; nous citerons simplement ici les types principaux de ces transformations :

Formation d'ébauches à bourgeons multiples :

A la face profonde de certains coelomastes et de quelques amas épithéliaux malpighiens, des assises cellulaires basophiles ont donné naissance à plusieurs bourgeons mammaires ; ces bourgeons sont en général assez courts (30 à 60 μ) et ne présentent pas de direction définie ; leur nombre varie de 2 à 4 ; ils prennent naissance en des points variables de la face profonde des coelomastes ou des amas malpighiens (fig. 41-43, pl. XV).

Formation d'ébauches à deux cordons mammaires :

De la face profonde de quelques amas épithéliaux malpighiens, sont issus deux cordons épithéliaux plus longs que les bourgeons multiples précédents : ils atteignent 150 à 300 μ de longueur et ils représentent deux cordons mammaires primaires ; ces cordons tirent toujours origine d'assises cellulaires basophiles situées à la face profonde de l'amas épidermique ; leur base est parfois contiguë (fig. 44-45), parfois nettement séparée (fig. 46-48, pl. XV).

*Hyperdéveloppement du mésenchyme
autour du cordon mammaire.*

Sous l'effet œstrogène, il se constitue précocement, autour du bourgeon mammaire, une enveloppe dense de mésenchyme ; les

cellules mésenchymateuses paraissent « activées », leur noyau s'hypertrophie, devient turgescent ; elles se disposent en assises parallèles, serrées autour du bourgeon.

Cet aspect spécial, cette densité du mésenchyme se retrouvent fréquemment chez les fœtus âgés de 17 ou de 18 jours, autour des formations dérivant de l'ébauche : on l'observe autour de la face profonde des célomastes (fig. 28, 29, 32), autour de la partie distale des invaginations épidermiques (fig. 30, 31, 35, 37), dans la partie centrale des mamelons dépourvus de glandes mammaires (fig. 18 à 20, pl. V), ou autour de la partie basale des cordons mammaires.

Nous avons étudié jusqu'ici les malformations mammaires provoquées par l'injection d'œstrogène à l'embryon âgé de 12 à 14 jours. Nous allons maintenant étudier les effets de cette hormone injectée au fœtus femelle âgé de 15 jours ; cette étude sera basée sur l'examen des fœtus femelles appartenant à deux portées : d'une part 4 fœtus ♀ ayant reçu chacun 94 γ de dipropionate d'œstradiol au stade de 15 jours 9 heures (tableaux V et IX) et, d'autre part, un fœtus ♀ d'une autre portée ayant reçu 50 γ de dipropionate d'œstradiol au stade de 15 jours 10 heures.

Contrairement à ce qui se passait lorsque l'injection était faite plus précocement, les œstrogènes n'exercent plus qu'un effet faible sur les ébauches mammaires, au stade de 15 jours : d'une façon générale, les ébauches mammaires des fœtus ainsi traités sont, à terme, bien développées et d'une longueur normale (fig. 49, pl. XVI) ou subnormale ; on n'observe plus d'inhibition totale ou partielle du développement du bourgeon mammaire ; il ne s'est pas formé, non plus, de célomastes, ni d'invaginations épidermiques, ni de duplications.

Les seules modifications que nous ayons observées dans le développement de la mamelle, après traitement à 15 jours, sont les suivantes :

La dernière paire d'ébauches mammaires (paire la plus caudale), présente parfois une légère réduction de croissance ; son trajet est à peu près rectiligne et la glande n'est pas ramifiée.

Certaines ébauches (en particulier les pectorales) ont une base élargie et conique.

L'aire mammaire est quelquefois épaissie : l'épithélium malpighien qui recouvre cette aire s'est légèrement épaissi vers l'intérieur (fig. 50, pl. XVI) et cet épaississement est plus important au niveau du point d'abouchement du cordon mammaire que sur les bords de l'aire mammaire.

Le mésenchyme qui entoure la base du cordon mammaire est plus dense qu'ailleurs et ses noyaux sont hypertrophiés.

TABLEAU IX. — Morphologie et structure (d'après l'examen histologique) des ébauches mammaires des fœtus femelles de souris ayant reçu, à l'âge de 15 jours, une injection de dipropionate d'œstradiol.

Désignation du fœtus. (N° de prélèvement)	Age du fœtus	Etat des ébauches mammaires pectorales (é.g.: ébauche gauche; é.dr.: ébauche droite)			Etat des ébauches mammaires inguinales. (é.g.: ébauche gauche; é.dr.: ébauche droite).	
		1ère paire	2ème paire	3ème paire	1ère paire	2ème paire
I736	18 jours 9 h. ± 8h.30	ébauches de structure normale. (mésenchyme à noyaux hypertrophiés).	ébauches de structure normale : (noyaux mésenchymateux environnants, hypertrophiés).	é.dr. : de structure sub-normale, l'épiderme de l'aire mammaire est épaissi, surtout en son centre. é.g. : de structure normale.	ébauches de structure normale.	ébauches de structure normale.
I737	id.	id.	id.	ébauches de structure normale ; à gauche l'aire mammaire est légèrement soulevée.	é.dr. : de structure normale. é.g. : de structure normale mais il y a un fort épaississement épidermique de l'aire mammaire, plus important au centre que sur les bords.	é.dr. : normale, mais il existe un épaississement conique de l'épiderme, à sa base. é.g. : structure normale, mais avec un léger épaississement de l'aire épidermique.
I740	id.	ébauches de structure sub-normale (base élargie).	é.dr. : sub-normale (base élargie, et paraît un peu courte) ; épaississement de l'épiderme de l'aire mammaire. é.g. : sub-normale (base élargie.)	ébauches de structure normale	ébauches sub-normales (paraissent légèrement réduites) é.dr. : à base légèrement élargie.	ébauches sub-normales ; paraissant un peu réduites en longueur.
I741	id.	ébauches de structure normale. (mésenchyme à noyaux hypertrophiés.)	ébauches de structure normale.	ébauches de structure normale.	ébauches sub-normales non ramifiées et paraissant courtes. (à droite il existe un petit épaississement conique de l'épiderme).	ébauches sub-normales, paraissant courtes ; l'épiderme de l'aire mammaire est légèrement et uniformément épaissi.

Dans l'ensemble, ces malformations sont légères et peu fréquentes, beaucoup moins importantes que celles qui s'observent après injection à des stades plus précoces.

2° FRÉQUENCE ET RÉPARTITION DES MALFORMATIONS MAMMAIRES OBSERVÉES CHEZ LES FŒTUS FEMELLES.

La fréquence des malformations mammaires provoquées par l'hormone œstrogène varie avec l'âge du fœtus au moment de l'injection et très vraisemblablement aussi avec la quantité d'hormone injectée. La répartition des anomalies varie suivant la position des ébauches.

a') *Rôle du facteur âge.*

La lecture des tableaux VII et VIII montre que les malformations mammaires provoquées par l'œstrogène sont très fréquentes lorsque le fœtus était âgé de 12 à 14 jours au moment de l'injection ; mais il n'en est plus de même lorsque l'injection a été faite au fœtus âgé de 15 jours : nous venons de voir qu'à ce stade les malformations provoquées sont rares, minimales ; la plupart des ébauches ont conservé une structure normale ou subnormale. Le stade de 15 jours marque donc la fin d'une période de grande sensibilité des ébauches mammaires à l'hormone œstrogène.

b') *Fréquence des malformations mammaires observées chez les fœtus femelles injectés à l'âge de 13 ou de 14 jours.*

Les tableaux VII et VIII indiquent les malformations mammaires existant chez chaque fœtus injecté : on voit que, chez 7 fœtus femelles, toutes les ébauches mammaires sont malformées (100 p. 100 d'anomalies) ; chez deux autres fœtus femelles (nos 1649 et 1691), 8 ébauches sur 10 sont nettement malformées.

La fréquence totale des malformations mammaires observées chez les 9 fœtus femelles étudiés et la fréquence des divers types de malformations sont rapportées dans les tableaux XI et X. La fréquence des malformations est élevée : sur un total de 90 ébauches étudiées, 86 sont malformées (soit plus de 95 p. 100) et trois sont subnormales (tableau XI). Ces chiffres mettent en évidence l'effet tératogène puissant des œstrogènes vis-à-vis des ébauches mammaires à ce stade de leur développement [46].

Les malformations les plus fréquentes sont représentées par les invaginations épidermiques développées à l'emplacement des ébauches mammaires : parmi les 90 ébauches étudiées, il y a 30 invaginations ectodermiques ; la suppression totale de l'ébauche mammaire est également fréquente : 29 cas sur 90 ; les coelomastes sont fréquents aussi : 10 cas sur 90 ; puis viennent les duplications, les ébauches comprenant deux parties (base épidermique et cordon mammaire), les inhibitions partielles, avec une fréquence de l'ordre de 5 à 7 p. 100.

c') *Fréquence des malformations mammaires observées chez les fœtus femelles injectés à l'âge de 15 jours.*

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le nombre des malformations mammaires rencontrées chez les fœtus injectés

à l'âge de 15 jours est faible : sur 40 ébauches étudiées dans la première série expérimentale, 2 ébauches seulement peuvent être considérées comme malformées, 15 sont subnormales et 23 ont un aspect normal ; de même chez le fœtus femelle appartenant à une autre série expérimentale, les ébauches sont normales ou subnormales.

D'autre part, les modifications de structure provoquées par l'injection, à ce stade, sont légères.

*d') Répartition des malformations mammaires
en fonction de la position des ébauches mammaires,
chez les fœtus injectés à l'âge de 13 et de 14 jours.*

Le tableau X indique, pour chaque paire d'ébauches mammaires, la nature et le nombre des malformations observées pour l'ensemble des 9 fœtus étudiés (les différentes paires d'ébauches ont été numérotées de 1 à 5, en partant de la I^{re} paire pectorale ; les IV^e et V^e paires d'ébauches correspondent donc respectivement à la I^{re} et II^e paire d'ébauches inguinales). Ce tableau montre que la répartition des grands types d'anomalies est variable suivant la position des ébauches : ainsi, au niveau de la I^{re} paire d'ébauches pectorales, on observe souvent des coelomastes (6 cas sur 18) ou une suppression totale ou partielle de l'ébauche (4 et 3 cas sur 18) ; au niveau de la II^e paire pectorale, on observe surtout des invaginations épidermiques (11 cas sur 18) ; les ébauches formées de deux parties (base épidermique et cordon mammaire) n'ont été observées qu'au niveau de la III^e paire pectorale ; au niveau de la I^{re} paire inguinale, on observe, à la fois, des invaginations épidermiques et une sup-

TABLEAU X. — Répartition des malformations mammaires en fonction de la position des ébauches mammaires, chez 9 fœtus de sexe femelle ayant reçu une injection directe d'hormone œstrogène à l'âge de 13 à 14 jours.

Nombre total d'ébauches mammaires examinées = 90.									
Position des ébauches.	Ebauches du type normal.	Ebauches faiblement modifiées. (sub-normales).	Suppression totale de l'ébauche.	Inhibition partielle de l'ébauche.	Coelomaste.	Invagination épidermique.	Simple réduction de taille de l'ébauche (de 1/4 à 1 environ).	Ebauche formée de 2 parties: cordon mammaire à base épidermique.	Duplication de l'ébauche.
Ebauches pectorales.									
1ère paire		2	4	3	6				3
2ème paire		1		2	I	II			3
3ème paire	I		2		I	8	I	5	
Ebauches inguinales.									
4ème paire			6		2	IO			
5ème paire			17			I			
TOTAL	I	3	29	5	IO	30	I	5	6

pression totale d'ébauches : enfin, la dernière paire d'ébauches mammaires (la plus caudale) est très fréquemment totalement arrêtée dans son développement (17 cas sur 18, soit une fréquence voisine de 95 p. 100).

Les réactions différentes des diverses paires d'ébauches mammaires à l'action œstrogène tiennent vraisemblablement à des différences existant dans l'état de développement des diverses paires d'ébauches au moment où l'hormone œstrogène commence à agir sur elles.

Les effets que nous venons de rapporter ont été obtenus avec des doses de dipropionate d'œstradiol injectées au fœtus femelle, comprises entre 40 et 150 γ . Nous étions limités, pour les doses supérieures, par l'impossibilité d'injecter au jeune embryon un volume plus grand de solution d'hormone, et, d'autre part, nous avions atteint la concentration maxima de la solution de dipropionate d'œstradiol dans l'huile d'olive pure (15 mg par centimètre cube). Par contre, une série de recherches reste à effectuer, en employant des doses inférieures à 40 γ .

Du point de vue pratique, il était surtout important d'étudier les effets, sur les ébauches mammaires des fœtus, de doses faibles injectées à la mère gravide ; et c'est ce que nous avons fait dans ce sens qui est rapporté dans la deuxième partie de ce travail.

Les injections directes d'hormone au fœtus montrent que c'est bien l'hormone œstrogène injectée qui agit sur les ébauches mammaires du fœtus, et non pas une substance de l'organisme maternel et c'est là un point essentiel acquis par ces expériences.

Les expériences consistant à injecter l'hormone œstrogène à la mère gravide (deuxième partie de ce travail) montrent que la fréquence des anomalies provoquées est fonction de la dose d'hormone injectée à la mère pour les doses comprises entre 50 et 1.000 γ .

La plus faible dose d'hormone œstrogène injectée directement au fœtus femelle âgé de 13 jours est de l'ordre de 40 à 50 γ (fœtus ♀ n° 1691) ; cette dose a provoqué des duplications

PLANCHE XIII

FIG. 37 et 38. — Sections histologiques à l'emplacement des premières ébauches mammaires inguinales, droite et gauche du fœtus femelle de souris n° 1659, âgé de 18 jours 9 heures $\pm$ 8 h. 30, pesant 921,3 mg ; ce fœtus avait reçu à l'âge de 13 jours 11 heures $\pm$ 8 h. 30, une injection de 150 γ de dipropionate d'œstradiol. On trouve, à l'emplacement de ces ébauches, de petits amas épithéliaux, de type malpighien, présentant des cellules basophiles dans leurs assises basales ; ces structures ne sont pas plus développées que ne l'état le bourgeon mammaire au stade de l'injection (Gr. = 232).

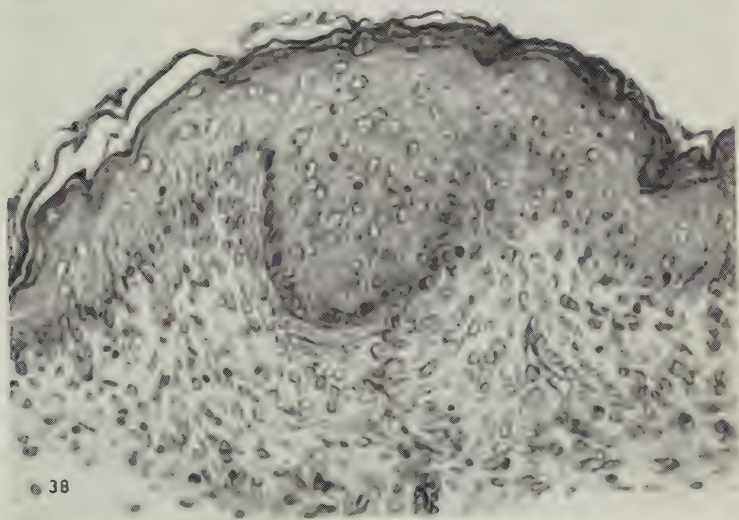
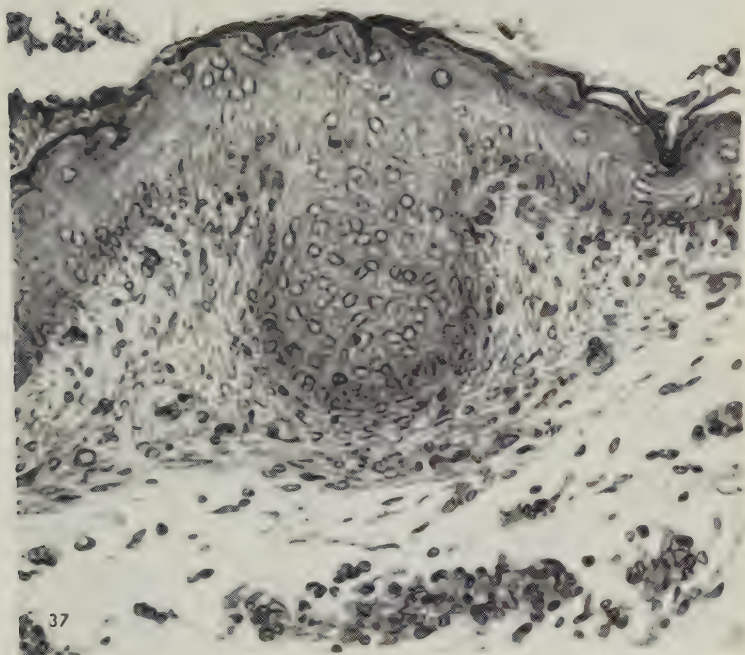


PLANCHE XIII.

PLANCHE XIV

FIG. 39. — Section histologique de la partie basale de la troisième ébauche mammaire pectorale gauche du fœtus femelle de souris n° 1649, âgé de 18 jours 16 heures $\pm$ 8 h. 30, pesant 1017,8 mg ; ce fœtus avait reçu à l'âge de 14 jours 11 heures $\pm$ 8 h. 30, une injection de 94 γ de dipropionate d'œstradiol dans sa cavité abdominale. Cette ébauche mammaire montre la pénétration, dans sa partie basale, d'un cordon de cellules épithéliales malpighiennes (Gr. $\approx$ 228).

FIG. 40 (les 3 photographies placées côte à côte). — Trois sections histologiques de la troisième ébauche mammaire pectorale gauche du fœtus de souris n° 1666, âgé de 18 jours 9 heures $\pm$ 6 heures, pesant 773 mg et ayant reçu une injection de 94 γ de dipropionate d'œstradiol à l'âge de 13 jours 13 heures $\pm$ 8 heures. Cette ébauche mammaire s'ouvre à l'extérieur par un large orifice kératinisé, se continue par un cordon de structure double, malpighien au centre, mammaire sur ses bords et ensuite par un cordon entièrement de type mammaire (Gr. = 228).

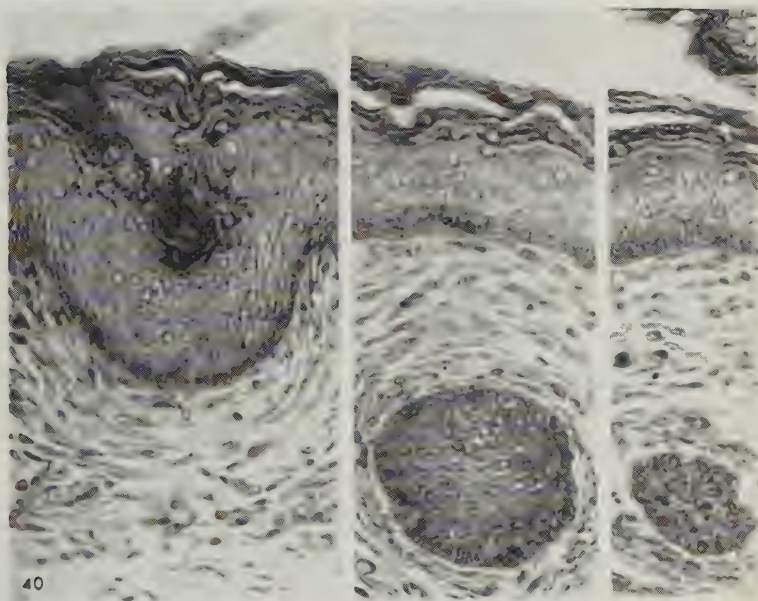
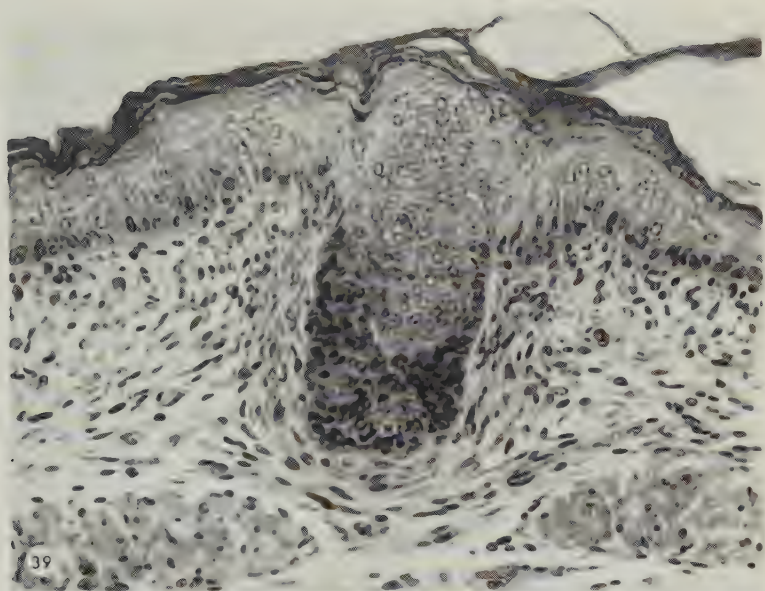


PLANCHE XIV.

PLANCHE XV

Les photographies de cette planche montrent des transformations du plan d'organisation spécifique de l'ébauche mammaire de la souris, sous l'influence d'une hormone oestrogène : sous cette influence, il s'est formé soit des bourgeons mammaires multiples (fig. 41 à 43), soit deux cordons mammaires primaires à base voisine (fig. 44 et 45), soit deux cordons mammaires primaires totalement distincts (fig. 46 à 48).

FIG. 41, 42, 43. — Trois sections histologiques du cœlomaste formé à l'emplacement de la première ébauche mammaire pectorale gauche du fœtus femelle de souris n° 1658, âgé de 18 jours 9 heures $\pm$ 8 h. 30, pesant 1174,5 mg ; ce fœtus avait reçu, à l'âge de 13 jours 11 heures, $\pm$ 8 h. 30, une injection de 75 γ de dipropionate d'œstradiol dans la cage thoracique. On voit sur ces trois photographies, 3 bourgeons mammaires distincts naissant à la base du cœlomaste (le bourgeon dont la base est visible sur la fig. 41 est assez long et représente déjà un petit cordon mammaire) (Gr. = 156).

FIG. 44. — Section histologique de la deuxième ébauche mammaire pectorale gauche du fœtus femelle de souris n° 1691, âgé de 18 jours 8 h. 30 $\pm$ 8 h. 30, pesant 1205,7 mg ; ce fœtus avait reçu, à l'âge de 13 jours 13 h. 30 $\pm$ 8 h. 30, une injection de 45 γ de dipropionate d'œstradiol dans le flanc droit. Cette ébauche mammaire a subi une modification dans sa morphogénèse et présente, à terme, deux cordons mammaires bien développés (on ne distingue sur la photographie que la base du cordon situé à droite), à base voisine (Gr. = 154).

FIG. 45. — Section histologique de la partie médiane de la deuxième ébauche mammaire pectorale droite du fœtus femelle de souris n° 1649, âgé de 18 jours 16 heures $\pm$ 8 h. 30, pesant 1017,8 mg ; ce fœtus avait reçu à l'âge de 14 jours 11 h. 30 $\pm$ 8 h. 30, une injection de 94 γ de dipropionate d'œstradiol dans la cavité abdominale. L'ébauche mammaire représentée sur cette section, possède deux cordons mammaires primaires à base voisine (on n'aperçoit que leur base sur la photographie) et un petit bourgeon secondaire (Gr. = 156).

FIG. 46, 47 et 48. — Trois sections histologiques de la première ébauche mammaire pectorale gauche du fœtus femelle de souris n° 1662, âgé de 18 jours 9 heures $\pm$ 8 heures, pesant 1076 mg ; ce fœtus avait reçu, à l'âge de 13 jours 13 heures $\pm$ 8 heures, une injection de 94 γ de dipropionate d'œstradiol dans la cavité abdominale. Cette ébauche mammaire a subi, sous cette influence, une transformation profonde de sa morphogénèse, conduisant à la formation de deux cordons mammaires primaires totalement distincts. On aperçoit, sur la fig. 46, le plus cranial de ces cordons mammaires ; la fig. 47 représente une coupe située 30 μ au-dessous de la précédente ; à ce niveau, il n'y a plus de cordon mammaire, mais seulement quelques cellules basophiles (provenant vraisemblablement du bourgeon mammaire) situées à la base d'un épaissement de l'épithélium de l'aire mammaire ; la fig. 48 représente une section faite 20 μ au-dessous de la précédente et montrant le second cordon mammaire primaire, de cette ébauche (Gr. = 156).

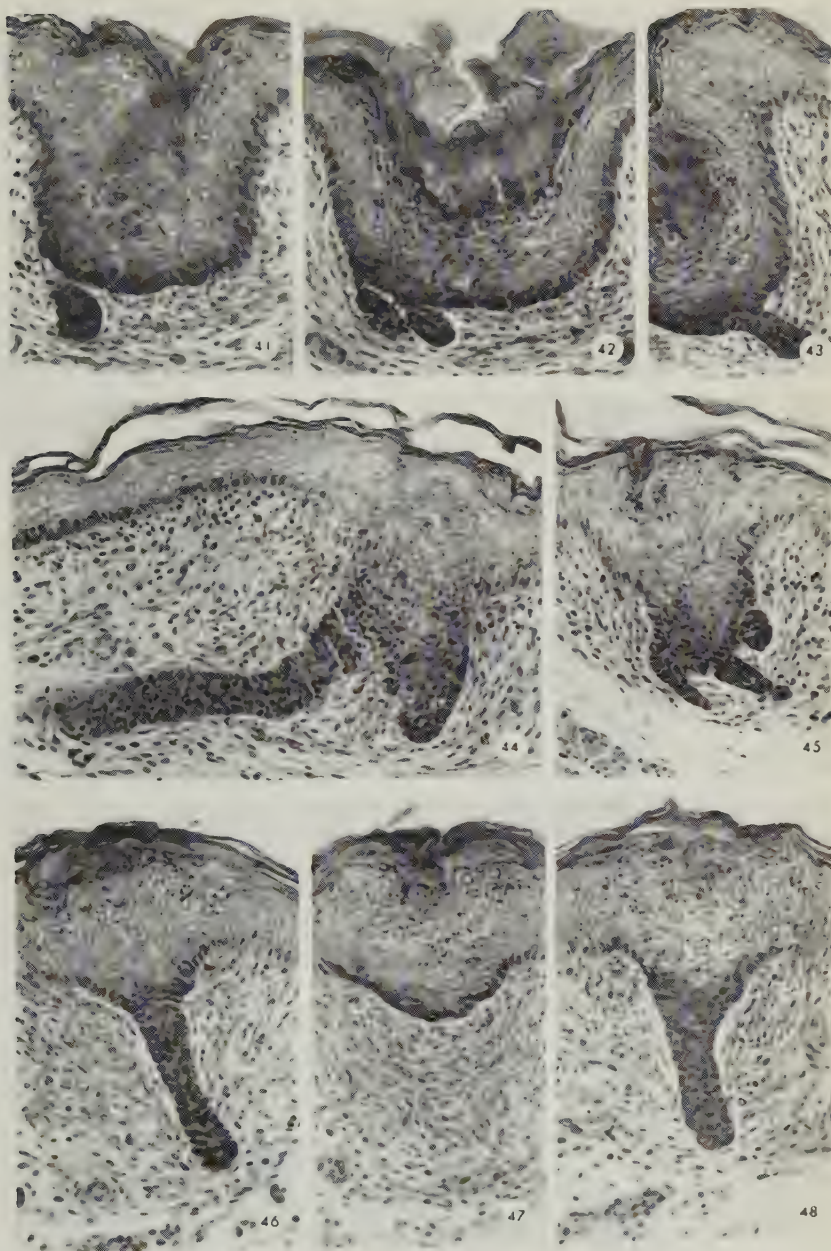


PLANCHE XV.

PLANCHE XVI

FIG. 49. — Section histologique de la deuxième ébauche mammaire pectorale droite du fœtus femelle de souris n° 1736, âgé de 18 jours 9 heures $\pm$ 8 h. 30, pesant 808,4 mg ; ce fœtus avait reçu, à l'âge de 15 jours 9 heures $\pm$ 8 h. 30, une injection de 94 γ de dipropionate d'œstradiol dans la cavité abdominale : cette injection d'œstrogène, à ce stade, n'a pratiquement pas modifié la morphogénèse des ébauches mammaires, qui sont bien développées à terme (Gr. = 231).

FIG. 50. — Section histologique de la base de la deuxième ébauche mammaire inguinale droite du fœtus femelle de souris n° 1737, âgé de 18 jours 9 heures $\pm$ 8 h. 30, pesant 848 mg ; ce fœtus appartient à la même portée que le précédent ; il avait reçu à l'âge de 15 jours 9 heures $\pm$ 8 h. 30, une injection de 94 γ de dipropionate d'œstradiol, dans la cavité abdominale ; ses ébauches mammaires sont bien développées, mais celle représentée sur cette photographie présente un épaississement conique de l'épithélium malpighien recouvrant l'aire mamelonnaire (Gr. = 228).

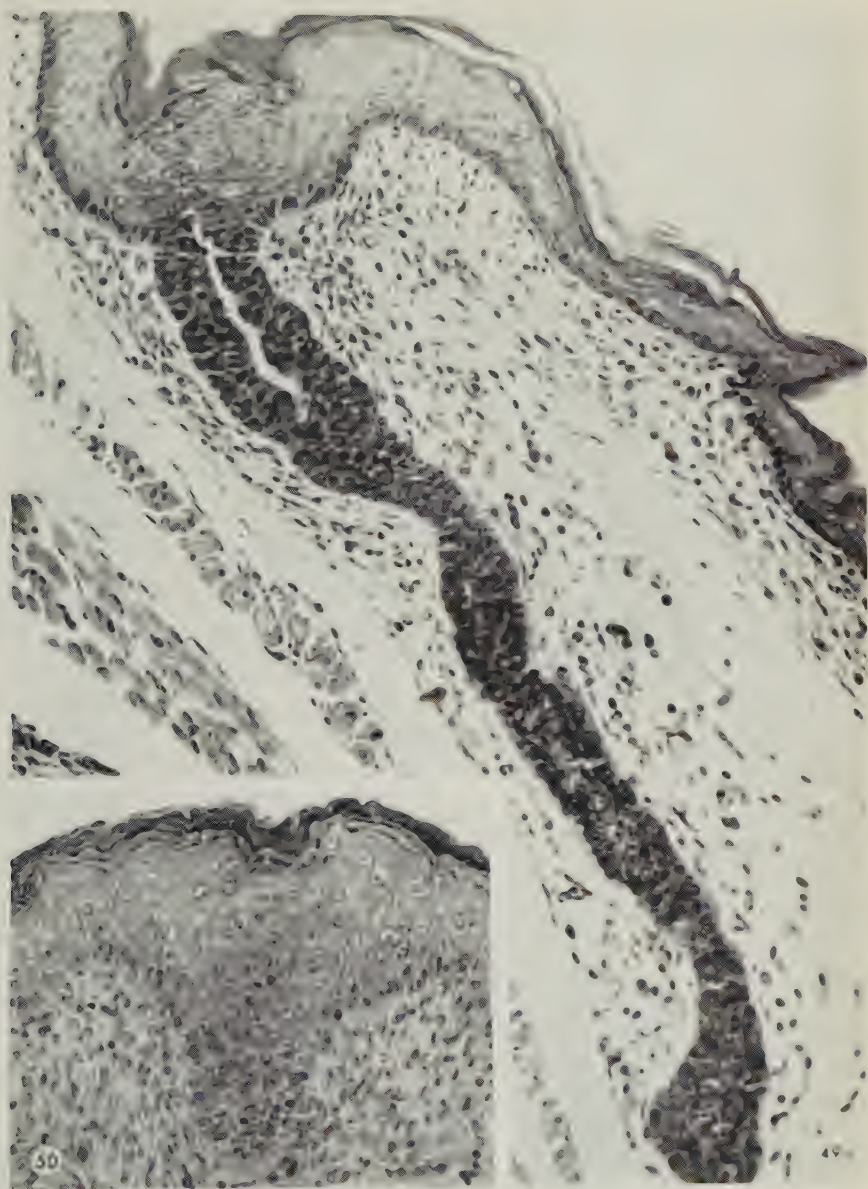


PLANCHE XVI.

d'ébauches, des inhibitions totales du développement du bourgeon mammaire et des invaginations ectodermiques.

γ) Etude des témoins.

Comme nous l'avons indiqué au début de ce chapitre (p. 58) diverses catégories de fœtus femelles et de nouveau-nés femelles de souris ont été étudiées pour servir de témoins dans ces recherches. Voici le résultat de cette étude.

a') Au cours de recherches effectuées par l'un de nous, depuis plusieurs années, pour étudier le développement fœtal normal de la glande mammaire de la souris, aucune malformation réelle des ébauches mammaires n'a été observée aux divers stades fœtaux étudiés (plus de 50 embryons et fœtus ont été examinés).

b') Dans les séries expérimentales il existe, dans les portées dont certains fœtus ont reçu une injection d'œstradiol, des fœtus non injectés qui n'ont pas été contaminés par l'hormone œstrogène injectée aux autres fœtus ; ces fœtus ne présentent pas de développement prématuré des mamelons ; leurs ébauches mammaires sont bien développées et ne présentent pas d'anomalie de leur développement : leur structure est normale ou subnormale.

c') Les ébauches mammaires des fœtus ayant reçu une injection d'huile d'olive dans leur cavité abdominale (au stade de 14 jours) ou dans la cavité amniotique (au stade de 12 jours) se sont développées d'une façon normale : à terme, ces ébauches sont bien développées ; en général elles sont ramifiées et bourgeonnent ; leur structure est normale ou subnormale (fig. 12 et 13, pl. IV et fig. 22, pl. VI). Certaines de ces ébauches présentent de légères modifications de leur morphologie : en particulier des irrégularités dans la formation de l'invagination circulaire épidermique délimitant le mamelon, ou une asymétrie dans la position du point d'insertion du cordon mammaire primaire dans l'aire mammaire ; ces modifications ne sont pas dues à l'action de l'huile d'olive, car on les observe assez fréquemment chez des nouveau-nés femelles normaux ; d'autre part, chez un de ces fœtus, les mamelles bien développées s'insèrent dans l'épiderme au fond de dépressions cutanées ; il est probable que cette configuration résulte simplement du moindre développement de ce fœtus (qui ne pèse que 749 mg).

d') Cent ébauches mammaires de 10 souris femelles nouveau-nées normales appartenant à 3 lignées sélectionnées ont été étudiées sur la totalité des coupes sériées qui les intéressent ; 208 ébauches mammaires, prises au hasard chez 30 souris femelles nouveau-nées normales, ont été étudiées sur quelques sections de leur région médiane (sections intéressant la base du cordon

mammaire primaire passant par son point d'insertion dans l'épiderme).

Parmi ces 308 ébauches mammaires de souris femelles normales nouveau-nées qui ont été étudiées, 4 présentent une anomalie de structure : ces 4 mamelles appartiennent à 3 nouveau-nés de la même portée (de la lignée XXXIX de M^{me} Dobrovolskaïa) et elles présentent la même anomalie : un amas de cellules sébacées s'est formé dans la paroi du cordon mammaire, à une courte distance de la base du cordon ; c'est là une anomalie particulière qui est très différente des malformations qui sont expérimentalement produites par les hormones sexuelles.

Les 304 autres ébauches mammaires étudiées ont une structure normale, ou, dans quelques cas, subnormale ; aucune d'elles ne présente de véritable malformation de structure générale, mais il existe entre elles quelques différences dans la morphologie et parfois quelques défauts. Voici les principales modifications que nous avons notées :

Existence d'une asymétrie : au lieu de se détacher du centre de l'aire mammaire, le cordon primaire se détache en un point plus ou moins éloigné du centre ; cette excentricité du point d'insertion du futur canal galactophore s'observe surtout au niveau de la I^{re} paire d'ébauches pectorales et parfois de la I^{re} paire inguinale.

Existence de variations dans le degré de développement de l'invagination épidermique circulaire délimitant le mamelon (capuchon épithélial) et existence d'asymétries dans cette invagination : bien développée chez certains nouveau-nés, cette invagination est rudimentaire, ou moins longue, chez d'autres ; d'autre part, dans une ébauche donnée, une partie de l'invagination est plus courte que l'autre ou tout à fait rudimentaire ; sur les sections de l'ébauche, ceci se traduit par l'existence de différences de longueur, d'épaisseur ou de forme, des deux points épithéliales qui représentent, de part et d'autre du cordon mammaire, la section de l'invagination.

Existence chez certains nouveau-nés, au niveau de quelques ébauches mammaires, d'un léger soulèvement de l'aire mammaire, rappelant un mamelon miniature.

Présence chez quelques nouveau-nés, dans quelques ébauches, de cellules très fortement colorées, en divers points du cordon mammaire primaire et de ses ramifications ; ces cellules sont uniformément et intensément colorées par l'hémalum ; leur accumulation, en certains points, s'accompagne d'un rétrécissement local du cordon mammaire allant jusqu'à une atrophie de ce conduit ; ces lésions sont assez rares.

Toutes ces modifications observées au niveau des ébauches mammaires de ces témoins sont donc assez légères ; aucune

d'entre elles n'est comparable aux malformations véritables de la morphologie mammaire provoquées par l'hormone œstrogène.

Il est difficile de définir exactement la signification de ces quelques modifications de la structure des ébauches mammaires témoins et de les classer : les différences observées dans le degré de développement ou l'asymétrie de l'invagination épithéliale délimitant le mamelon ne correspondant probablement qu'à des différences de croissance fœtale ou à une extension variable de la surface cutanée, ou à l'existence de plis autour de l'aire mammaire ; aussi ne les considérons-nous pas comme des altérations réelles de la structure de la glande. Par contre, l'insertion excentrique de certains cordons mammaires, dans l'aire mammaire, doit correspondre à une véritable malformation ; nous lui

TABLEAU XI. — Fréquence des malformations mammaires chez les fœtus de souris ayant reçu une injection d'une dose de 40 à 250 γ de dipropionate d'œstradiol, chez les fœtus témoins et chez les souris femelles nouveau-nées normales.

	Nombre de fœtus étudiés	Nombre d'ébauches mammaires examinées	Répartition des ébauches mammaires d'après leur structure générale		
			Nombre d'ébauches normales	Nombre d'ébauches sub-normales	Nombre d'ébauches malformées
Injection d'hormone œstrogène	au fœtus âgé de 12 à 14 jours	9 ♀	1	3	86
		10 ♂	10	6	28 anormales. 56 absentes
	au fœtus âgé de 15 jours	4 ♀	23	15	2
TÉMOINS (X)	Injection d'huile d'olive au fœtus (intra-abdominale à 14 jours, ou dans la cavité amniotique à 12 jours)	3 ♀	19	0	0
		2 ♂	14	0	6 absentes
	Souris ♀ nouveau-nées normales	10 ♀	98	2	0
	Souris ♀ nouveau-nées normales (XX)	30 ♀	203	1	4
		208 (ébauches prises au hasard).			

(X) Il n'est pas tenu compte, dans ce tableau comparatif, de l'excentricité du point d'insertion du cordon mammaire dans l'aire mammaire, anomalie qui s'observe chez un certain nombre de fœtus.

(X X) Ébauches étudiées sur quelques sections médianes seulement ; toutes les autres ébauches figurant sur ce tableau ont été étudiées sur coupes sériées.

consacrons une étude ailleurs ; comme le cordon mammaire conserve une structure normale et que cette anomalie n'a pas été observée, ou ne peut être étudiée, chez les fœtus traités par les œstrogènes (dont les ébauches sont parfois profondément transformées), nous n'en tiendrons pas compte ici dans l'établissement d'un tableau comparatif.

En conclusion, nous pouvons dire que nous n'avons pas rencontré d'anomalie mammaire congénitale chez les fœtus de souris normaux ou témoins que nous avons étudiés ; nous avons, par contre, observé 4 malformations des ébauches mammaires et quelques défectuosités légères seulement parmi les 308 ébauches mammaires de souris femelles nouveau-nées normales (appartenant à 5 lignées sélectionnées différentes), que nous avons étudiées (4).

Le tableau général XI résume les résultats essentiels de cette étude de la fréquence des malformations mammaires provoquées par l'hormone œstrogène et de la fréquence des modifications des ébauches rencontrées chez les témoins.

Il met en évidence l'effet tératogène puissant des œstrogènes, sur les ébauches mammaires fœtales.

b) Malformations mammaires observées chez les fœtus mâles ayant reçu une injection d'hormone œstrogène.

Les malformations mammaires provoquées chez les fœtus mâles sont, dans l'ensemble, semblables à celles que l'œstrogène provoque chez les fœtus femelles dans des conditions de traitement identiques ; aussi n'en ferons-nous pas ici une étude détaillée. Les malformations que nous avons trouvées chez les mâles sont brièvement décrites dans les tableaux VII et VIII. La lecture de ces tableaux montre que l'hormone œstrogène provoque les principales modifications suivantes de la morphogénèse des ébauches mammaires et des mamelons :

(4) Little et Mc Donald ont décrit [47], en 1945, les diverses anomalies et variations qu'ils ont rencontrées dans l'appareil mammaire de 4 296 souris appartenant à 8 lignées sélectionnées différentes. Ils ont observé : a) des déficiences dans le nombre et la fonction des mamelles ; b) des mamelles surnuméraires, et c) des variations dans la position des mamelles. Parmi les déficiences mammaires, ils ont noté : une réduction du mamelon, une absence du mamelon, une absence du mamelon et de la mamelle correspondante.

Parmi les souris femelles nouveau-nées, appartenant à 5 lignées différentes que l'un de nous (A. R.) a eu l'occasion d'étudier (plus de 50) histologiquement, sur coupes sériées, aucune ne présentait d'absence de mamelles : les 5 paires de mamelles étaient normalement développées chez toutes.

a') Le développement prématuré des mamelons et diverses endothélies ;

b') L'inhibition totale ou partielle du développement du bourgeon mammaire ;

c') La formation d'invaginations malpighiennes ;

d') La formation d'amas malpighiens sans morphologie définie ;

e') La formation d'ébauches formées de deux parties : à une partie basale épidermique, fait suite un cordon mammaire ;

f') La formation d'ébauches à bourgeons multiples ;

g') L'hyperdéveloppement mésenchymateux autour du bourgeon mammaire ;

h') La non-séparation de certaines ébauches mammaires et de l'épiderme, soit que l'ébauche soit reliée, à terme, à l'épiderme par une base épidermique, soit qu'il s'agisse d'une ébauche rudimentaire (court cordon mammaire attaché à l'épiderme).

La fréquence de ces malformations est considérable : au total, sur 100 ébauches examinées (appartenant à 10 fœtus mâles), il y en a 28 qui sont anormales, 56 absentes, 6 qui sont subnormales et 10 qui sont du type normal (tableaux XI et XII) ; et, chez un fœtus donné, les 10 ébauches sont parfois malformées (voir tableaux VII à VIII). Signalons à ce sujet, que parmi les 10 fœtus étudiés, il y en a deux, n° 1652 et n° 1682, dont les ébauches mammaires n'ont que faiblement réagi à l'hormone œstrogène injectée (peut-être par suite d'une diffusion insuffisante ou lente de la solution huileuse injectée, qui ne s'est peut-être que lentement résorbée) ; chez le fœtus n° 1652, la distance ano-génitale est grande (1,2 mm) et les testicules sont descendus, ce qui indique que l'action œstrogène a été peu marquée sur le tractus génital également ; chez le fœtus n° 1682 la distance ano-génitale est égale à 0,9 mm. Chez ces deux fœtus, nombre d'ébauches mammaires ont évolué normalement ou d'une façon subnormale ; chez les huit autres fœtus, le nombre des ébauches anormales est compris, pour un individu donné, entre 8 et 10.

La malformation la plus fréquemment observée consiste en une suppression totale de l'ébauche mammaire : 56 ébauches, sur les 100 étudiées, ont été totalement supprimées ; cette suppression porte principalement sur la I^{re} paire pectorale (sur 20 ébauches de cette paire, examinées, il y a 16 cas de mamelons sans mamelle), sur celles de la III^e paire (9 cas sur 20) et sur celles de la V^e paire (16 cas sur 20 ébauches étudiées de cette II^e paire inguinale). Dans l'appréciation de ces résultats, il faut tenir compte du fait que, chez le fœtus mâle normal, un certain nombre d'ébauches mammaires sont fréquemment inhibées (quelques ébauches pectorales et souvent les ébauches de la II^e paire inguinale) ; le nombre des ébauches détruites varie dans les diffé-

TABLEAU XII. — Répartition des malformations mammaires en fonction de la position des ébauches mammaires chez 10 fœtus de sexe mâle ayant reçu une injection directe d'hormone œstrogène à l'âge de 12 à 14 jours.

(Nombre total d'ébauches mammaires examinées: 100)								
Position des ébauches	Ebauches de type normal (X)	Ebauches faiblement modifiées (sub-normales)	Suppression totale de l'ébauche	Inhibition partielle de l'ébauche.	Coelomaste.	Invagination épidermique.	Simple réduction de taille, (de 1/4 à 1 environ)	Ebauche formée de deux parties: cordon mammaire à base épidermique.
Ebauches pectorales.	1ère paire	2	16		2			
	2ème paire	2	5			2	1	8
	3ème paire	4	9				3	2
Ebauches inguinales.	4ème paire	4	10	2		2		2
	5ème paire		16	4				
TOTAL	10	6	56	6	2	4	4	12

(X) Les ébauches « normales » sont représentées ici par de courts cordons mammaires détachés de l'épiderme, isolés dans le tissu conjonctif sous-cutané.

rentes lignées; la fréquence des suppressions totales ou sub-totales d'ébauches, notée chez les fœtus mâles traités par l'hormone œstrogène, ne relève donc pas de la seule action de l'hormone œstrogène.

Les ébauches formées de deux parties, à base épidermique prolongée par un cordon mammaire assez court, sont assez fréquentes: 12 cas sur 100 ébauches examinées; les coelomastes, les invaginations épidermiques, les simples réductions de taille des ébauches ou les inhibitions partielles sont assez peu fréquentes, leur pourcentage est de l'ordre de 2 à 6 p. 100.

Le tableau XII résume la répartition de ces diverses malformations en fonction de la position des ébauches mammaires. A la liste des malformations précédentes, il faut ajouter une modification de structure assez légère et que nous avons rencontrée assez peu fréquemment (nous ne l'avons observée que dans 3 cas sur les 100 ébauches examinées): elle consiste en la présence, à l'extrémité basale de cordons mammaires détachés de l'épiderme (de type mâle), d'un petit amas de tissu éosinophile; cette sorte d'enclave est située dans la lumière de la partie basale dilatée du canalicule mammaire ou dans la paroi de cette partie; il s'agit sans doute là d'un tissu d'origine épidermique qui est resté attaché à la base du cordon mammaire au moment de sa séparation d'avec l'épiderme. Comme le canalicule mammaire, isolé dans le mésenchyme sous-épidermique, a gardé dans l'ensemble une configuration sensiblement normale, nous avons classé ces ébauches comme subnormales dans le tableau XI et

nous n'avons pas fait figurer cette légère modification de structure dans le tableau XII.

c) *Fréquence comparée des diverses malformations mammaires chez les fœtus mâles et les fœtus femelles.*

La comparaison des tableaux X et XII montre qu'il existe des différences importantes dans la proportion des malformations mammaires chez les fœtus des deux sexes.

α) La suppression totale ou subtotale du développement du bourgeon mammaire est beaucoup plus fréquente chez les fœtus de sexe mâle (56 cas sur 100 ébauches étudiées) que chez les fœtus femelles (29 cas sur 90) ; il est probable que l'hormone mâle du fœtus a ajouté son action à celle de l'hormone œstrogène, dans ce phénomène, chez les fœtus mâles traités. Rappelons ici, que nous avons obtenu deux fœtus mâles totalement dépourvus d'ébauches mammaires.

β) Les cœlomastes sont beaucoup plus rares chez les fœtus mâles que chez les fœtus femelles : nous n'en avons observé que 2 cas chez les mâles, contre 10 cas chez les fœtus femelles ; il faut rappeler ici que, contrairement à ce qui se passe chez les fœtus femelles, la I^{re} paire de mamelons pectoraux est presque toujours bien développée chez les fœtus mâles traités à 12, 13 ou 14 jours par une hormone œstrogène ; à l'apex de ces mamelons, on ne trouve en général plus de trace d'ébauches mammaires ; au contraire, les cœlomastes sont fréquents au niveau de la I^{re} paire d'ébauches pectorales des fœtus femelles traités.

γ) Les invaginations malpighiennes sont beaucoup moins fréquentes chez les fœtus mâles (4 cas seulement sur 100 ébauches étudiées) que chez les fœtus femelles (30 cas sur 90 ébauches).

Il est probable que ces différences sexuelles de réaction des ébauches mammaires au stimulus œstrogène tiennent principalement à deux facteurs : a) au mode différent de morphogénèse des ébauches mammaires dans les deux sexes : chez les fœtus mâles, les ébauches mammaires se séparent de l'épiderme, ou bien sont détruites au moment où, chez les fœtus femelles, se constitue le col épidermique qui reliera ensuite l'ébauche à l'épiderme ; l'absence de formation de cette tige épidermique doit être à l'origine de la très faible fréquence des cœlomastes et des invaginations épidermiques (5) ; b) à la présence de l'hormone testiculaire qui, chez les fœtus mâles, est, à elle seule, déjà responsable de la destruction d'un certain nombre d'ébauches.

(5) Chez certains fœtus mâles traités, il s'est cependant constitué de petites invaginations épidermiques.

RÉSUMÉ DE LA PREMIÈRE PARTIE.

I. Les principaux stades du développement embryonnaire de la glande mammaire de la souris sont décrits ; les différences sexuelles de cette histogénèse sont mises en évidence : séparation des ébauches mammaires d'avec l'épiderme et destruction de certaines ébauches chez les fœtus mâles ; les processus histologiques de ces phénomènes (qui sont régis par le testicule fœtal) sont étudiés.

II. L'action sur les ébauches mammaires des fœtus femelles, du propionate de testostérone injecté à la souris gravige, est étudiée : cette hormone androgène masculinise l'histogénèse des ébauches femelles ; sous son action la formation du mamelon est inhibée, les ébauches mammaires se séparent de l'épiderme et certaines d'entre elles sont inhibées dans leur développement.

III. L'influence, sur le développement de la mamelle, d'une hormone œstrogène injectée au fœtus de souris, *in utero*, est étudiée : 162 embryons âgés de 12 à 15 jours ont reçu une dose de 40 à 250 γ de dipropionate d'œstradiol ; 42 d'entre eux ont survécu jusqu'à terme et ont été étudiés histologiquement sur coupes sérieées.

L'hormone œstrogène altère fortement le développement fœtal de la glande mammaire et provoque de nombreuses malformations de la mamelle et du mamelon.

Les principales malformations obtenues sont les suivantes :

1° Inhibition totale du développement du bourgeon mammaire ; 2° inhibition partielle de ce développement ; 3° formation, à l'emplacement des ébauches, de poches cutanées tapissées par un épithélium malpighien kératinisé épais (œlomastes) et absence totale ou subtotal de mamelle ; 4° formation, à l'emplacement des ébauches mammaires, d'invaginations malpighiennes, cordonales ; 5° formation d'amas malpighiens sans morphologie définie ; 6° formation d'ébauches à deux constituants : une base épidermique et un cordon mammaire plus ou moins anormal ; 7° des transformations du plan spécifique de structure générale de l'ébauche mammaire ; 8° hyperdéveloppement du mésenchyme autour du bourgeon mammaire.

La structure histologique des diverses malformations est décrite.

La répartition et la fréquence des malformations mammaires chez les fœtus injectés sont étudiées : après injection de 40 à 150 γ de dipropionate d'œstradiol au fœtus femelle âgé de 12 à 14 jours, 95 p. 100 des mamelles présentent des malformations graves. Ces chiffres mettent en évidence l'effet tératogène puissant des hormones œstrogènes sur les ébauches mammaires, à ce stade de leur développement.

L'influence de l'état de développement des ébauches mammaires sur leur capacité de réaction aux œstrogènes est étudiée : il existe une période de grande sensibilité des ébauches à cette hormone, et le stade de 15 jours marque la fin de cette période.

Ces résultats expérimentaux établissent que les hormones sexuelles, androgènes et œstrogènes ont la capacité de provoquer des malformations congénitales nombreuses et variées, de la glande mammaire. Ils apportent une explication de l'origine de nombre de malformations mammaires « spontanées » connues de longue date chez la femme et chez diverses espèces animales : il est probable que ces malformations congénitales sont également dues à l'action, sur les ébauches mammaires fœtales, de substances chimiques du groupe des hormones sexuelles.

SUMMARY OF THE FIRST PART.

The present investigation deals with the normal fetal development of the mammary gland of the mouse and with its modifications by sexual hormones.

I. Sexual differences exist in normal mammary histogenesis : in male fetuses, the mammary buds separate from epidermis ; some other buds are destroyed ; these phenomena are due to the hormonal action of the fetal testis.

II. In female fetuses, male hormone (testosterone propionate) injected into pregnant mouse, provokes a male histogenesis of the mammary gland : mammary buds separate from the epidermis and some others are destroyed ; the formation of the nipple is inhibited.

III. Estrogenic hormone (estradiol dipropionate) injected directly into the fetus, bring about numerous congenital malformations of the mammary gland and of the nipple : 1° total inhibition of the development of the mammary anlage ; 2° partial inhibition of the anlage ; 3° the formation, at the site of a gland, of a cutaneous pouch (cœlomast) with or without a residue of the gland ; 4° formation, at the site of a gland, of a malpighian invagination ; 5° formation of a gland with a malpighian component and a mammary part ; 6° transformation of the specific general organisation of the gland ; 7° hyperdevelopment of mesenchyme around the mammary bud.

After injection of 40 to 50 γ of estradiol dipropionate to female fetuses aged from 12 to 14 days, 95 p. 100 of the mammary glands show congenital malformations. By these results is established the powerful teratogenic action of the œstrogenic hormones upon the mammary anlage.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. PUECH. *Les mamelles et leurs anomalies, étudiées au point de vue de l'anatomie, de la physiologie et de l'embryogénie*. F. Savy, édit., Paris, 1876.
- [2] W. R. WILLIAMS. *J. Anat. Physiol.*, 1891, **25**, 225-255.
- [3] W. R. WILLIAMS. *J. Anat. Physiol.*, 1891, **25**, 304-305.
- [4] O. SCHULTZE. *Münch. med. Woch.*, 1892, **39**, 432.
- [5] K. BASCH. *Archiv. Gyn.*, 1893, **44**, 15-54.
- [6] W. R. WILLIAMS. *A monograph on diseases of the breast, their pathology and treatments*. J. Bale and Sons, édit., London, 1894.
- [7] G. DAUTHUILE. *Contribution à l'étude des anomalies mammaires dans leur rapport avec l'embryologie* (Thèse Fac. Méd. et Pharm. de Lyon, janvier 1899). A. Rey, édit., Lyon.
- [8] F. DUNAUD. *Des vices de conformation du mamelon* (Thèse de doctorat en Médecine, mars 1908. Fac. mixte Méd. et Pharm. de Toulouse).
- [9] W. L. RODMAN. *Diseases of the breast with special reference to cancer*. Sidney Appleton, édit., London, 1908.
- [10] E. M. GUEST. *Brit. med. J.*, 1923, **2**, 85 (correspondance).
- [11] D. C. L. FITZWILLIAMS. *On the breast*. W. Heinemann, édit., Londres, 1924.
- [12] M. DARTIGUES. *Bull. Mém. Soc. Méd. Paris*, 1935, **139**, 575-579.
- [13] R. GRAHAM-CAMPBELL. *Brit. med. J.*, 1936, **1**, 471.
- [14] C. W. TURNER. *The comparative anatomy of the mammary glands*. University cooperative Store, édit., Columbia, Missouri, 1939.
- [15] R. CORDIER. *Les mamelles et leurs anomalies* (Thèse Fac. Méd. et Pharm. de Lyon, avril 1941). Bosc Frères et M. et L. Riou, édit., Lyon, 1941.
- [16] C. F. GESCHICKTER. *Diseases of the breast. Diagnosis, pathology, treatment*. J. B. Lippincot Company, édit., U. S. A., 2^e édit., 1945.
- [17] J. DEBEYRE. Anomalies mammaires. in article Mamelles. *Encyclopédie médico-chirurgicale*, Paris, 3^e édit., 1949, p. 811.
- [18] C. W. TURNER. *The mammary glands. I. The anatomy of the udder of cattle and domestic animals*. Lucas Brothers, édit., Columbia, Missouri, 1952.
- [19] C. W. TURNER et E. T. GOMEZ. *Mo. Agr. Exp. Sta. Res. Bul.*, 1933, n° 182, 1-43.
- [20] B. I. BALINSKY. *Trans. Roy. Soc. Edinburgh*, 1949-1950, **62**, part I, p. 1-31.
- [21] B. I. BALINSKY. *J. Anat.*, 1950, **84**, 67-68 (*Proc. Anat. Soc. of Great-Britain and Ireland*, février 1949).
- [22] B. I. BALINSKY. *J. Anat.*, 1950, **84**, 227-235.
- [23] A. RAYNAUD. *Annales Endocrinol.*, 1947, **8**, 349-359.
- [24] A. RAYNAUD et J. RAYNAUD. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147**, 1872-1876.
- [25] A. RAYNAUD. *Annales Endocrinol.*, 1949, **10**, 54-62.
- [26] A. RAYNAUD et J. RAYNAUD. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147**, 1962-1967.
- [27] A. RAYNAUD et M. FRILLEY. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 1380.

- [28] A. RAYNAUD et M. FRILLEY. *Bull. Soc. Zool. France*, 1949, **74**, 156-159.
- [29] R. R. GREENE, M. W. BURRILL et A. C. IVY. *J. exp. Zool.*, 1941, **87**, 211-232.
- [30] A. RAYNAUD. *Modification expérimentale de la différenciation sexuelle des embryons de souris, par action des hormones androgènes et œstrogènes*. Actualités scientifiques et industrielles, 1942, n^{os} 925 et 926. Hermann, édit., Paris.
- [31] A. RAYNAUD. *Annales Endocrinol.*, 1947, **8**, 248-253.
- [32] R. R. GREENE, M. W. BURRILL et A. C. IVY. *Science*, 1938, **88**, 130-131.
- [33] A. RAYNAUD. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 289-291.
- [34] A. RAYNAUD. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 872-875.
- [35] R. R. GREENE, M. W. BURRILL et A. C. IVY. *Am. J. Anat.*, 1940, **67**, 305-345.
- [36] R. R. GREENE, M. W. BURRILL et A. C. IVY. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1939, **41**, 169-170.
- [37] A. RAYNAUD. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 218-221.
- [38] A. RAYNAUD. *Annales Endocrinol.*, 1947, **8**, 318-329.
- [39] A. RAYNAUD. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 150-152.
- [40] A. RAYNAUD. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 404-407.
- [41] A. RAYNAUD. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 544-549.
- [42] A. RAYNAUD et J. RAYNAUD. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 784-788.
- [43] A. RAYNAUD et J. RAYNAUD. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 848-853.
- [44] A. RAYNAUD et J. RAYNAUD. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 963-968.
- [45] A. RAYNAUD. *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 674-676.
- [46] A. RAYNAUD. *C. R. Soc. Biol.*, 1955, **149**, 1229-1233.
- [47] C. C. LITTLE et H. Mc DONALD. *J. Heredity*, 1945, **36**, 285-288.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°.)

Séance du 3 Novembre 1955

Présidence de M. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.

COMMUNICATIONS

PRÉSENCE D'AGGLUTININES ANTI-A OU ANTI-B DANS LE SÉRUM DE CERTAINS SINGES CYNOMORPHES CATARRHINIENS (*PAPIO PAPIO* DESM.)

par J. FINE et A. EYQUEM.

*Laboratoire d'Hématologie et des Groupes sanguins.
Centre d'Etudes des Groupes sanguins des Animaux
[Service R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE]]*

L'intérêt de l'individualisation de nouveaux antigènes érythrocytaires humains a conduit à l'examen systématique des iso-agglutinines irrégulières, et depuis ces dernières années, à l'étude des phyto-agglutinines. Certaines de ces dernières sont spécifiques des antigènes A, B, H, N.

Les hémagglutinines naturelles d'origine animale ont été moins étudiées : on en connaît d'homologues aux antigènes A, B, H, P, Les communautés antigéniques entre l'homme et les singes pouvaient faire supposer l'existence naturelle d'agglutinines correspondant à certains antigènes érythrocytaires.

Chez les orangs-outans qui possèdent l'antigène B (50 p. 100), ou l'antigène A (30 p. 100), on n'a trouvé que l'agglutinine anti-A (1). Chez les gibbons ou les gorilles, qui sont le plus souvent du groupe B et plus rarement des groupes A ou AB, on n'a trouvé que l'agglutinine anti-B.

Les chimpanzés appartiennent dans 90 p. 100 des cas au groupe A ; ils possèdent dans ce cas l'agglutinine anti-B ; lorsqu'ils appartiennent au groupe O, ils possèdent les agglutinines anti-A ou anti-B.

(1) Voir Dujarric de la Rivière et Eyquem, Landsteiner et Miller, Wiener, Weinert, Troisier, Voronoff, Candela, Dahr.

Parmi les singes cynomorphes, *Macacus rhesus* possède l'agglutinine anti-A, *Macacus sylvanus*, l'anti-B, *Macacus cynomolgus*, les agglutinines anti-A, anti-B.

Notre étude a porté sur 60 singes cynomorphes du groupe des Catarrhiniens, appartenant au genre *Papio papio* Desm. (communément appelé babouin ou cynocéphale).

HÉMAGGLUTININES SÉRIQUES CHEZ LE CYNOCÉPHALE. — Le sérum de tous les individus examinés (60) appartenant à cette espèce agglutine fortement les globules rouges humains, quel que soit l'agglutino-gène de groupe sanguin présent sur ces globules rouges. Ceci met en évidence l'existence d'une hétéro-agglutinine anti-globules rouges

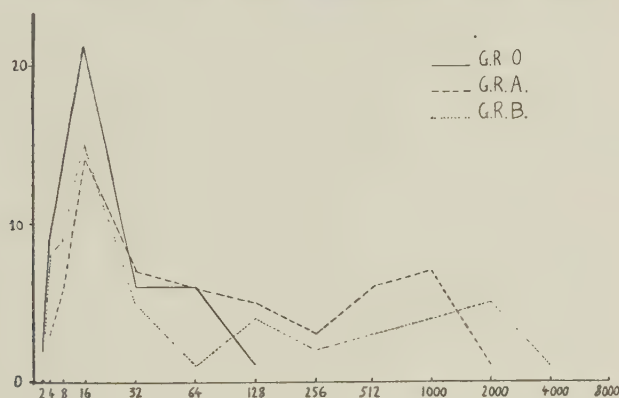


FIG. 1. — Répartition des titres des agglutinines vis-à-vis des globules rouges A, B, O (nombre d'individus en ordonnées).

humains, chez les individus de cette espèce. Mais si l'on effectue des titrages de cette hétéro-agglutinine dans chaque sérum, vis-à-vis de globules rouges humains A, B, O, on s'aperçoit qu'il existe, en plus de cette hétéro-agglutinine, des agglutinines décelant spécifiquement les antigènes humains A et B. Si l'on établit, en effet, les courbes de fréquence du titre agglutinant observé vis-à-vis des globules rouges A, B et O, en portant en ordonnée le nombre d'individus et en abscisse, les titres exprimés par le dénominateur de la fraction indiquant la dilution du sérum, on obtient une courbe à un seul clocher pour les globules du groupe sanguin O et une courbe à deux clochers pour les globules rouges A et B. Le premier clocher correspond à l'hétéro-agglutinine anti-humaine et est superposable à la courbe obtenue pour les globules rouges O ; le deuxième clocher correspond à une agglutinine anti-A ou anti-B (fig. 1).

Sur 57 sérums ainsi titrés, on trouve :

19 sérums contenant une agglutinine anti-A agglutinant les globules rouges A à des titres allant de 1/128 à 1/2 000, alors que les

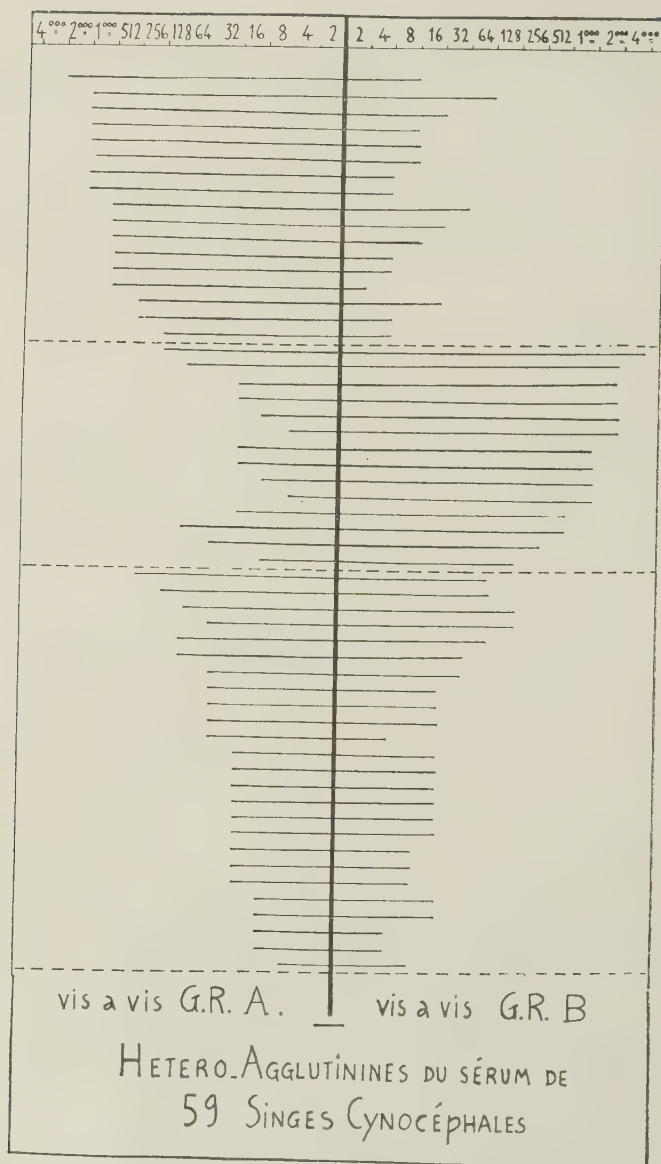


FIG. 2.

globules rouges B et O ne sont agglutinés qu'à des titres beaucoup plus faibles (1/2 à 1/16).

14 sérums contenant une agglutinine anti-B et agglutinant les globules rouges B, à des titres allant de 1/128 à 1/4 000, alors que les globules rouges A et O ne sont agglutinés qu'à des titres de 1/4 à 1/32.

Enfin, 24 sérums agglutinent les globules rouges A, B et O, à des titres similaires (fig. 2).

Le titre de l'agglutinine possédée par les singes est le même quels que soient les caractères antigéniques des globules rouges mis en contact. Il n'y a pas de relation avec la présence sur ces globules des antigènes Rh (CDE, cde) MN, Lewis, Duffy, Kell.

La spécificité de ces agglutinines anti-A et anti-B a été établie par des épreuves d'absorption élective. Nous n'en donnerons que les deux exemples suivants :

SÉRUM	TITRE AGGLUTINANT vis-à-vis de globules rouges humains		
	A	B	O
Cynocéphale n° 59	1 000	4	8
Absorbé par GR A	—	—	—
Absorbé par GR B	512	—	—
Absorbé par GR O	512	—	—
Cynocéphale n° 57	8	256	8
Absorbé par GR A	—	256	—
Absorbé par GR B	—	—	—
Absorbé par GR O	—	256	—

En conclusion, le sérum de tous ces singes cynocéphales contient une hétéroagglutinine anti-humaine. Chez certains, à cette hétéroagglutinine vient s'ajouter une agglutinine anti-A et chez d'autres une agglutinine anti-B.

HÉMAGGLUTINOGENES CHEZ LE CYNOCÉPHALE. — La recherche des agglutinogènes humains A et B sur les érythrocytes de cynocéphales a été effectuée à l'aide de réactions d'absorption des agglutinines anti-A et anti-B d'origine humaine, de titre élevé (1/2 000 pour l'anti-A ; 1/1 000 pour l'anti-B). L'examen de 12 échantillons de globules rouges de cynocéphales n'a pas révélé d'antigène A et l'examen de 17 échantillons de globules rouges de cynocéphales n'a pas révélé d'antigène B.

Les réactions d'agglutination effectuées à l'aide du sérum de 40 cynocéphales, mis en contact avec des suspensions de globules rouges de 16 sujets de la même espèce, nous a permis par contre, d'observer des réactions d'iso-agglutination attribuables à la présence de deux isoagglutinines naturelles décelant deux antigènes de plus. Ces iso-

agglutinines sont sérologiquement indépendantes des agglutinines anti-A ou anti-B. Mais l'établissement d'un système de groupes sanguins chez cette espèce ne peut être élaboré que par des études portant sur un plus grand nombre d'animaux.

Il est à remarquer que les cynocéphales examinés se partagent en trois groupes : les uns (24/57) possédant seulement une hémagglutinine anti-humaine non-spécifique d'un antigène de groupe sanguin connu ; d'autres (19/57) possédant une agglutinine anti-A et ne possédant pas anti-B ; enfin un dernier groupe (14/57) possédant une agglutinine anti-B et pas d'agglutinine anti-A.

L'absence de développement concomitant des agglutinines anti-A ou anti-B prend un certain intérêt en considérant le rôle que la tolérance immunitaire peut jouer dans l'inhibition du développement des iso-agglutinines.

BIBLIOGRAPHIE

- P. DAHR. *Z. Rassenphys.*, 1936, **8**, 145 ; 1937, **9**, 124 ; 1938, **10**, 78.
 R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et A. EYQUEM. *Les groupes sanguins des animaux*. Flammarion, édit., Paris, 1954.
 K. LANDSTEINER et Ph. MILLER. *J. exp. Med.*, 1925, **42**, 841.
 J. TROISIER. *Ann. Inst. Pasteur*, 1928, **42**, 363.
 S. VORONOFF. *Les groupes sanguins chez les Singes*. Doin, édit., Paris, 1949.
 H. WEINERT. *Z. Rassenphys.*, 1931, **4**, 8 ; 1932, **5**, 59 ; 1933, **6**, 75 ; 1938, **10**, 7.
 A. S. WIENER, *Blood Groups and Transfusion*. Ch. C. Thomas, édit., Springfield, Ill., 1943.

ÉTUDE DE LA MALADIE HÉMOLYTIQUE EXPÉRIMENTALE DU MULETON. TRANSMISSION PAR VOIE PLACENTAIRE

par O. GIRARD, M^{me} L. PODLIACHOUK, A. EYQUEM et P. MILLOT.

(Institut Pasteur. Centre d'Etudes des Groupes sanguins des Animaux.
 Laboratoire d'Hématologie et des Groupes sanguins
 [Service R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE])

La maladie hémolytique du muleton est due à l'immunisation de la jument mulassière vis-à-vis des antigènes d'origine asine. Ces antigènes sont constitués par des substances spécifiques d'espèce et par des facteurs de groupe sanguin de l'âne. On connaît encore assez mal les conditions de réalisation de cette immunisation. On peut supposer qu'elle se produit par passage des globules rouges du muleton dans la circulation maternelle, au moment de l'accouchement. En effet, pendant la gestation, on doit considérer que le placenta épithélio-

chorial des équidés interpose, entre les sangs fœtal et maternel, une barrière complexe puisqu'elle comporte cinq obstacles différents, dont deux endothéliums et deux épithéliums. Il est possible cependant que des échanges puissent se produire à la faveur de lésions nécrotiques du placenta (Bruner).

Depuis les observations de Caroli et Bessis, puis de Millot et Gorius, on sait que l'agglutinine peut atteindre un titre très important. Ce titre baisse très rapidement dans les quarante-huit heures qui suivent la naissance, si bien que la prophylaxie de la maladie hémolytique du muletton peut être réalisée en supprimant l'allaitement, lorsque le colostrum contient une agglutinine anti-baudet d'un titre supérieur à $1/32$.

Brion a reproduit expérimentalement la maladie hémolytique du muletton en immunisant des juments à l'aide de globules rouges de baudet. Dans ce cas, les jeunes muletons non-allaités par leur mère n'ont pas présenté d'ictère, bien que la mère possédât dans son sérum une agglutinine de titre élevé.

Opérant dans des conditions analogues, Pigoury et Charry (1951) ont obtenu un ictère du muletton, par immunisation intentionnelle de la mère, suivie d'allaitement.

Cependant, les expériences de Lemétayer et de ses collaborateurs ont montré que les anticorps étaient susceptibles de traverser le placenta et de passer dans la circulation du poulain à une concentration non négligeable. Il était donc logique de supposer que, dans le cas d'immunisation intentionnelle et prolongée, l'apparition d'anticorps de faible poids moléculaire pouvait être accompagnée d'un passage transplacentaire et entraîner, chez le poulain, un syndrome hémolytique avant tout allaitement.

C'est ainsi que trois juments :

N° 21, possédant les antigènes de groupes sanguins A C F I,

N° 0 31, possédant les antigènes de groupes sanguins A C E F I,

N° 578, possédant les antigènes de groupes sanguins A C D E F, ont été immunisées à l'aide de globules rouges d'un baudet avec lequel elles ont été accouplées.

1° La jument 21 met bas le 23 janvier 1954 un poulain du groupe sanguin C I parfaitement normal. Cette jument possède une agglutinine titrant $1/256$ dans son sérum sanguin et $1/1\,000$ dans son colostrum. Le sérum du poulain ne possède pas d'agglutinine anti-asine.

2° La jument 0 31 possédant les antigènes érythrocytaires A C E F I donne naissance le 15 janvier 1954 à un muletton appartenant au groupe sanguin A B C E F et qui présente une très forte asthénie dès la naissance, ainsi qu'un ictère prononcé.

A l'examen de son sang, on constate que le plasma est coloré par de l'hémoglobine en même temps que le muletton est ictérique. Il n'existe pas d'iso-agglutinines dans le sérum du muletton. Le sérum de la mère présentait, un mois avant la naissance, une agglutinine anti-baudet titrant $1/1\,000$ et une agglutinine anti-B titrant $1/32$. Après la naissance, l'agglutinine anti-baudet titrait $1/2\,000$.

Malgré une exsanguino-transfusion, l'animal meurt trente heures

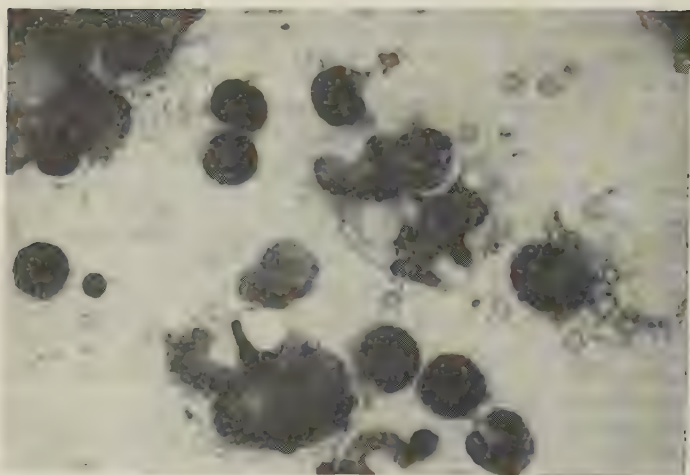


FIG. 1. — Erythroplagocytes dans le sang périphérique (Mouton 578 F.).

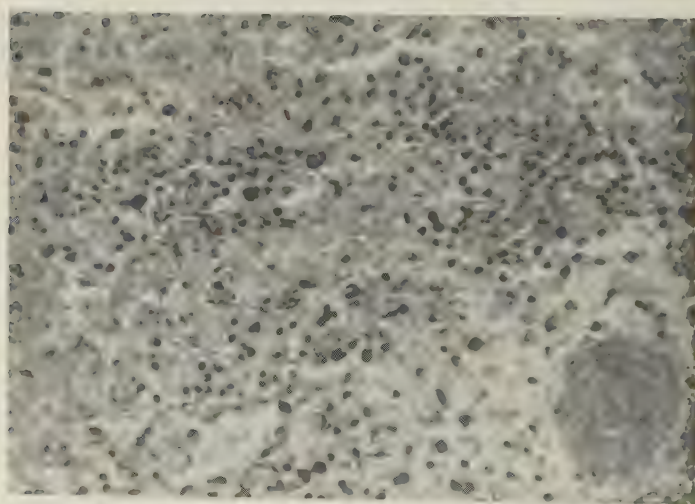


FIG. 2. — Coupe de rate; lésions spléniques (Mouton 578 F.).

après la naissance. L'examen histologique montre une érythrophagocytose dans le foie et dans la rate.

3° La *jument 578*, de groupe sanguin A C D E F, présente le 15 janvier 1954 une agglutinine anti-âne titrant 1/1 000 associée à une agglutinine anti-B titrant 1/8. Elle donne naissance le 8 février 1954 à un muleton de groupe sanguin A B C D F qui est immédiatement isolé de sa mère et qui, néanmoins, présente au bout de quelques heures un ictère très accentué et dont le sang présente une auto-agglutination manifeste, associée à une hémoglobinémie intense, à une grande fragilité globulaire et une érythrophagocytose très impor-

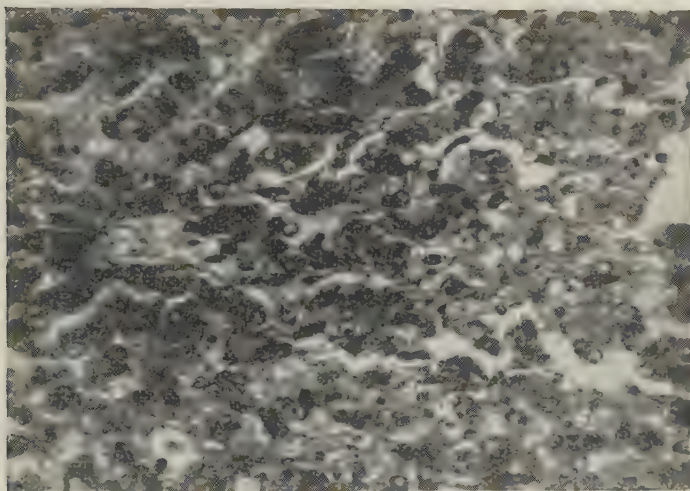


FIG. 3. — Coupe de foie ; lésions hépatiques (Muleton 578 F.).

tante dans le sang périphérique. Dans le colostrum de la jument, on trouve une agglutinine anti-asine titrant 1/8 000 et dans le sérum titrant 1/500.

La réaction directe de Coombs est très fortement positive sur les globules rouges du muleton. On pratique chez cet animal une exsanguino-transfusion douze heures après la naissance, à l'aide du sang d'un cheval vis-à-vis duquel le muleton ne possède pas d'agglutinines sous forme complète ou incomplète.

L'animal meurt quarante-huit heures après. Il présente un tableau typique de maladie hémolytique suraiguë confirmée par l'examen histologique. La rate présente une surcharge pigmentaire très importante, le foie une dilatation des sinusoides avec érythrophagocytose et surcharge pigmentaire.

Cette observation présente un intérêt indéniable du fait de l'apparition de la maladie hémolytique avant tout allaitement.

On peut donc admettre que dans le cas d'hyperimmunisation les anticorps peuvent traverser le placenta.

BIBLIOGRAPHIE

- A. EYQUEM et L. PODLIACHOUK. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 57 et 1953, **85**, 621.
R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et EYQUEM. *Les groupes sanguins chez les animaux*. Flammarion, édit. Paris, 1954, 407 pages.

ANERGIE DES SUJETS TUBERCULEUX TRAITÉS PAR LA TUBERCULINE

par FERNAND TISON.

(*Sanatorium de Praz-Coutant*)

Nous voudrions apporter ici un fait nouveau, intéressant les processus cellulaires de résistance contre la tuberculose, que nous avons étudiés avec notre maître Ch. Gernez-Rieux et C. Voisin [1].

Nous avons eu l'occasion de suivre ou de revoir 17 malades traités au cours des vingt-cinq dernières années par la « alt-tuberculine » allemande brute.

Certains auteurs cités par Canetti [2] pensent que la tuberculine peut sensibiliser à la tuberculine. La répétition des intradermo-réactions en doses croissantes peut, chez un animal neuf, entraîner une légère positivité des dernières. Chez l'homme, au cours des tests répétés de sensibilité progressive, il est parfois constaté le réveil des premiers, primitivement négatifs, sous l'effet des derniers qui, plus concentrés, ont sensibilisé le sujet.

D'autres auteurs nient cette possibilité. Il n'a jamais été obtenu, par exemple, de sensibilisation à la tuberculine par des produits *solubles*. Les impuretés peuvent cependant provoquer une « hétéro-allergie ».

Avec P. E. Davy [3], nous avons montré que ces réactions étaient variables selon la tuberculine employée.

Les conditions furent ici extrêmement différentes, puisque les doses reçues en concentration croissante pouvaient dépasser un total de 20 g.

Les premières injections étaient de 1/4 de centimètre cube d'une solution au cent millième. Elles étaient hebdomadaires.

A la fin du traitement, les injections sous-cutanées pouvaient atteindre 2 g de tuberculine *pure* en une fois.

ALLERGIE CUTANÉE A LA TUBERCULINE. — Le fait que ces malades supportaient, sans réaction locale, des injections sous-cutanées de plus

de 1 g de produit pur laissait prévoir le résultat des recherches : *à la fin du traitement les réactions cutanées à la tuberculine sont nulles.*

L'intradermoréaction à la tuberculine pure est négative. Cette désensibilisation semble devoir persister.

ALLERGIE CUTANÉE AUX CORPS MICROBIENS. — Les travaux de De Assis, de Rosenberg, de Silvieria ont montré que la désensibilisation par le BCG entraînait une anergie cutanée à la tuberculine.

Nous avons vérifié que le phénomène inverse pouvait se produire et que les malades en question étaient, après traitement par la tuberculine, anergiques au bacille.

Les tests cutanés pratiqués avec le BCG tué de l'Institut Pasteur sont restés négatifs.

Ceci confirme l'idée de Canetti que « rien d'important ne s'oppose à ce que l'allergie à la tuberculine soit assimilée à l'allergie au bacille de Koch ».

Le microscope montre d'ailleurs souvent, dans les tuberculines, la présence de corps microbiens.

ALLERGIE FOCALE ET GÉNÉRALE. — Dix de ces malades ont pu, en cours de traitement, être suivis cliniquement par nous. Ils ont été examinés après chaque injection. A la suite des premières (1/1 000 de milligramme) aucune réaction ne se manifeste. Après accroissement des doses (1/100 de milligramme) apparaissent des manifestations focales (auscultation), générales (fièvre), et locales (rougeur, chaleur).

Ces réactions disparaissent ensuite pour des doses plus fortes, et ceci accompagne l'extinction de l'allergie cutanée.

Une fois de plus l'allergie cutanée semble le reflet exact de l'hyper-sensibilité générale [4]. Hypersensibilité et immunité sont des processus cellulaires qui intéressent toute l'économie.

HÉMAGGLUTINATION ET HÉMOLYSE CONDITIONNÉE. — Pour sept de ces malades, nous avons voulu connaître si la désensibilisation s'accompagnait de modifications sensibles de leur sérum quant au taux d'hémagglutination des hématies sensibilisées à la tuberculine, ou au taux d'hémolyse conditionnée (Middelbrook [4], Gernez-Rieux et Tacquet [5]). Ces mesures ont été faites à la fin du traitement après injection de fortes doses.

Certes, les taux n'avaient pas été étudiés avant traitement. Mais leur inconstance après (ils varient sans raison apparente de 0 à 1/256) montre qu'il n'y a pas augmentation significative des anticorps. Il est vrai que ces réactions n'intéressent que les anticorps polysidiques et que les polysides utilisés pour la réaction se comportent comme un haptène.

Nous n'avons pas l'intention de tirer ici des conclusions cliniques sur l'opportunité des modifications cellulaires entraînées par la tuberculine. L'absence de test cellulaire d'immunité que nous déplorions à Toulouse [4] nous prive d'un élément important.

Mais nous avons pensé que ces faits, pour fragmentaires qu'ils soient, venaient compléter certaines données d'actualité.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Ch. GERNEZ-RIEUX, F. TISON et C. VOISIN. *Rapport au II^e Congrès de la Tuberculose*. Toulouse, 1953.
[2] CANETTI. *L'allergie tuberculeuse chez l'homme*, Flammarion, édit., Paris 1946.
[3] P. E. DAVY et F. TISON. *Rev. Tuberc.*, 1949, **43**, 762.
[4] MIDDLEBROOK. *Am. Rev. Tuberc.*, 1950, **62**, 223.
[5] Ch. GERNEZ-RIEUX et TACQUET. *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **84**, 149.

LYSE PRÉCOCE, PROVOQUÉE PAR LE CHLOROFORME, CHEZ LES BACTÉRIES INFECTÉES PAR DU BACTÉRIOPHAGE

par JANINE SÉCHAUD et E. KELLENBERGER.

(Laboratoire de Biophysique, Institut de Physique,
Université de Genève)

Il est important de pouvoir étudier le développement intracellulaire des bactériophages avant que se produise la lyse spontanée [1]. On connaît différentes méthodes pour provoquer artificiellement la lyse des bactéries infectées : traitement par des ultrasons [2], lyse du dehors par surinfection des complexes avec de hautes multiplicités d'un autre phage [3], explosion due à la détente brusque d'un gaz soluble fortement comprimé [4, 5], traitement par de fortes concentrations de glycine [6]. Nous avons constaté que la lyse précoce des complexes peut aussi être facilement obtenue par l'action du chloroforme, à partir du moment où les bactéries contiennent au moins une particule infectieuse. Cette propriété du chloroforme a été observée au cours d'expériences où nous tentions de dénombrer les phages libres présents dans une suspension, après élimination des complexes par le chloroforme, selon le procédé indiqué par Frédéricq [7]. Dans cette note, nous présentons le résultat de quelques expériences démontrant l'existence d'une lyse précoce des complexes sous l'effet du chloroforme.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES. — Nous avons étudié la multiplication des phages T2, T4 et λ après infection, respectivement d'*Escherichia coli* B et d'*Escherichia coli* K12S, ainsi qu'après induction d'*E. coli* K12 (λ) lysogène.

Les milieux suivants ont été employés :

- a) Milieu tryptoné : 1 p. 100 Bacto tryptone (Difco), 0,5 p. 100 NaCl.
b) Milieu synthétique M9 : 0,7 p. 100 Na_2HPO_4 ; 0,3 p. 100 KH_2PO_4 ; 0,05 p. 100 NaCl ; 0,1 p. 100 NH_4Cl ; 0,4 p. 100 glucose ; CaCl_2 0,0001 M ; MgSO_4 0,001 M.

c) Milieu synthétique M9 enrichi d'acides aminés (Difco) 1 p. 100.

d) Tampon phosphatique : 0,7 p. 100 Na_2HPO_4 ; 0,4 p. 100 NaCl ; 0,3 p. 100 KH_2PO_4 ; 0,02 p. 100 MgSO_4 .

Le pH normal de ces milieux est de 7,1-7,2.

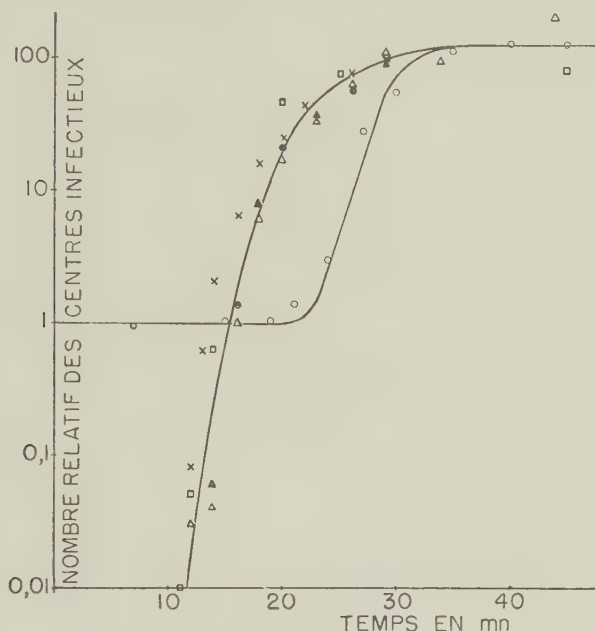


FIG. 1. — Apparition intracellulaire et libération par lyse spontanée du bactériophage T4, se multipliant sur *E. coli* B.

- (a) phages libérés spontanément (multiplicité d'infection, $m = 0,01$).
- △ (b) phages libérés par le chloroforme, à pH 8 ($m = 0,01$).
- ▲ (c) phages libérés par le chloroforme, à pH 7,2 ($m = 0,01$).
- (d) phages libérés par le chloroforme, à pH 6,6 ($m = 0,01$).
- (e) phages libérés par le chloroforme, à pH 8, culture concentrée en milieu aminé ($m = 1,5$).
- × (f) phages libérés par lyse du dehors, d'après Doermann [3].

Les dénombrements de bactériophages ont été effectués par les techniques classiques décrites par Adams [8].

RÉSULTATS. — Courbes de production de phages. — La figure 1 représente la production spontanée de phage (a) et la production observée après action du chloroforme (b-e) sur les complexes *E. coli* B phage T4.

Une culture aérée, contenant environ $3 \cdot 10^8$ bactéries/ml est centri-

fugée, les bactéries sont remises en suspension dans un milieu identique, puis infectées avec des proportions de phages variant de 0,1 à 1,5 par bactérie. Après trois à quatre minutes d'adsorption à 37° avec aération, les suspensions sont diluées de telle sorte que 1 ml contienne environ 3.10^4 bactéries infectées. A temps variables, des échantillons sont prélevés, dilués dans du tampon de pH choisi contenant 3 à 6 gouttes de chloroforme pour 5 ml. Ces suspensions

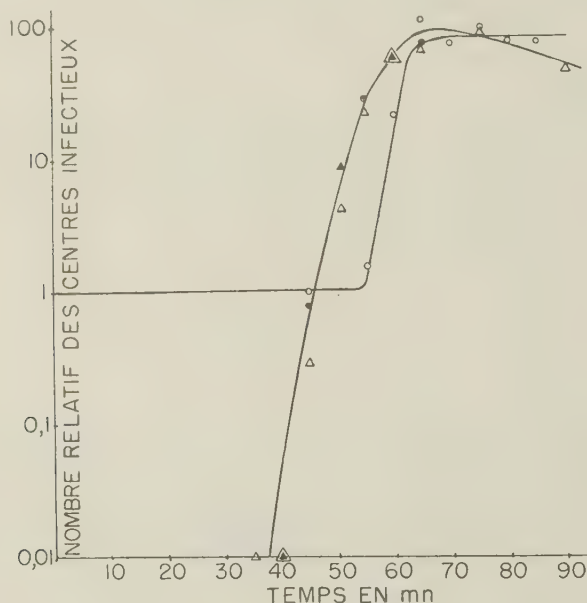


FIG. 2. — Libération de phages λ par K12 (λ) induit par les UV.

- lyse spontanée.
- △ lyse par le chloroforme, pH 8.
- ▲ lyse par le chloroforme, pH 7,2.
- lyse par le chloroforme, pH 6,6.

sont agitées vigoureusement pendant quelques secondes et, quinze à trente minutes plus tard, l'étalement sur gélose en présence de bactéries indicatrices est effectué selon la technique de la gélose en surfusion.

La courbe *e* a été obtenue à partir d'une culture concentrée (8.10^8 centres infectieux/ml) en milieu synthétique enrichi d'acides aminés. Le traitement par le chloroforme a été effectué sur des échantillons non dilués ; pour réduire la réadsorption, ces échantillons ont été refroidis rapidement ; nous avons, en effet, constaté que le chloroforme ne détruit pas la capacité d'adsorption des bactéries.

La lyse provoquée par le chloroforme est indépendante du milieu

employé. La période latente minima est de vingt et une à vingt-deux minutes, et c'est vers la quinzième minute qu'on peut mettre en évidence la présence d'une particule infectieuse, en moyenne, par bactérie.

Avec le bactériophage T2, nous avons obtenu un nombre de plaques plus élevé en milieu alcalin ($\text{pH} = 7,5$) qu'en milieu acide ($\text{pH} = 6,5$). Ce résultat semble être dû non pas à une diminution de l'effet lytique du chloroforme, mais à une inactivation comparable à celle décrite par Sagik [40]. Il nous paraît donc préférable, pour les expériences courantes, d'opérer à un pH compris entre 7,5 et 8.

Sur la figure 2 sont présentés les résultats d'une expérience de lyse provoquée par le chloroforme chez *E. coli* K12 (λ) induit par le rayonnement ultraviolet [9]. Une culture contenant environ 3.10^8 bactéries/ml est diluée à 1/100 dans du tampon, puis exposée pendant quarante secondes à 1 m de distance, à l'action d'une stérilampe Westinghouse WL 782 L. Dans ces conditions, le développement du phage est induit dans 97 p. 100 des bactéries. La suspension irradiée est diluée en milieu tryptoné de manière que 1 ml contienne environ 3.10^4 centres infectieux. Le traitement par le chloroforme est effectué dans les mêmes conditions que précédemment. On constate que l'effet du chloroforme est indépendant du pH . La période latente minima pour le développement du phage λ chez les bactéries lysogènes induites est de cinquante-cinq minutes et c'est vers la quarante-cinquième minute qu'il existe en moyenne une particule infectieuse par bactérie.

Cinétique de la lyse provoquée par le chloroforme. — Il est important de connaître la rapidité avec laquelle le chloroforme provoque la lyse des complexes. Pour cela, nous avons agité les complexes avec le chloroforme, puis nous avons effectué les étalements à des temps variables : après deux minutes, la lyse paraît complète.

Nous avons également contrôlé la cinétique de la lyse en suivant la densité optique. Nous avons constaté que six minutes après infection par T4, le chloroforme ne provoque pas la lyse des complexes. Ajouté douze minutes après l'infection, ou plus tard, le chloroforme provoque une lyse rapide ; en dix minutes, la valeur de la densité optique descend à un dixième de la valeur initiale. Les mesures sont rendues difficiles par la présence de gouttelettes de chloroforme qui restent en suspension pendant un temps relativement long.

Inactivation des phages par le chloroforme. — Nous avons traité par le chloroforme des lysats frais de phages T3, T4, T5 et λ , de titres connus et débarrassés des bactéries par centrifugation. Une légère inactivation peut être observée, mais elle ne dépasse cependant jamais 20 p. 100.

DISCUSSION. — Les expériences qui viennent d'être présentées démontrent que le traitement par le chloroforme est un moyen très efficace de provoquer artificiellement la lyse des complexes phage-bactérie, à partir du moment où sont formées les premières particules infectieuses.

Le décalage d'environ une minute qui peut être observé entre les courbes de Doermann [3] et les nôtres, est probablement imputable

à de petites différences dans les conditions de culture (telle que la température, par exemple).

La lyse provoquée par le chloroforme s'avère être plus rapide et plus simple que celles obtenues par les autres méthodes connues. Toutefois, son emploi est limité par le fait qu'elle n'est utilisable que sur des populations bactériennes contenant déjà au moins une particule infectieuse en moyenne par bactérie.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. E. LURIA. *General Virology*. Wiley and Sons, New-York, 1953.
- [2] T. F. ANDERSON et A. H. DOERMANN. *J. gen. Physiol.*, 1952, **35**, 657.
- [3] A. H. DOERMANN. *J. gen. Physiol.*, 1952, **35**, 645.
- [4] D. FRASER. *Nature*, 1951, **167**, 33.
- [5] R. I. DE MARS, S. E. LURIA, H. FISHER et C. LEVINTHAL. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 113.
- [6] R. I. DE MARS. *Virology*, 1955, **1**, 83.
- [7] P. FREDERICQ. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 327.
- [8] M. H. ADAMS. *Methods in medical research*, vol. 2, Year Book Publ., Chicago, 1950.
- [9] J. J. WEIGLE et M. DELBRUCK. *J. Bact.*, 1951, **62**, 301.
- [10] B. P. SAGIK. *J. Bact.*, 1954, **68**, 430.

SUR LA PRÉSENCE DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* DANS LES CONJONCTIVITES SAISONNIÈRES EN TUNISIE

par MAURICE HUET.

(Institut Pasteur de Tunis)

Il est classique d'attribuer les conjonctivites saisonnières, relativement bénignes, et extrêmement répandues en Afrique du Nord, au bacille de Koch-Weeks. Ce bacille, appelé également *Haemophilus aegyptus* ou *H. conjunctivitis*, est une bactérie appartenant au groupe des hémophiles, très proche du bacille de Pfeiffer, *H. influenzae*, sinon identique à celui-ci. Il a été vu à l'examen direct par Koch [1] au cours d'une épidémie de conjonctivite en Egypte, puis cultivé pour la première fois par Weeks [2] ; malheureusement, la description que ces deux auteurs nous en ont laissée, remarquable pour l'époque, est trop incomplète aujourd'hui pour pouvoir affirmer ou nier l'identité du bacille de Koch-Weeks et du bacille de Pfeiffer. Par ailleurs, aucun critère valable n'a été publié, à notre connaissance, permettant une différenciation facile de ces deux espèces. Si bien que, dans la pratique, l'habitude a été prise d'étiqueter *a priori* bacille de Weeks tout hémophile isolé de la conjonctivite et bacille de Pfeiffer tout hémophile autre que *H. pertussis* isolé des voies respiratoires ou

du liquide céphalo-rachidien. Cette façon de voir ne correspond pas à la réalité.

En effet, nous avons pu mettre en évidence quelques souches de *H. influenzae* authentique parmi les hémophiles isolés à partir de conjonctivites saisonnières. Voici de quelle façon :

Dès l'apparition des premières conjonctivites [au mois de mars, dans le sud tunisien] (1), nous avons pu isoler quelques souches de *Haemophilus* sp. et, en vue d'un essai de classification sérologique ultérieur, nous avons préparé des lapins par injections intraveineuses de suspension vivante de ces bactéries. Comme nous venions de recevoir de l'Institut Pasteur de Paris (2) des souches de *H. influenzae* authentique, nous avons voulu voir tout de suite si une différence pouvait être mise en évidence, par la séroagglutination, entre nos souches et celles reçues de Paris. Dans l'ensemble, les sérums que nous venions de préparer ne donnaient d'agglutination qu'à un taux très faible et uniquement avec la souche homologue ; cette agglutination était d'un type fin, granulaire. Mais notre surprise a été grande de constater que, si le sérum préparé avec une de nos souches (numérotée souche 11, Tunis) agglutinait cette souche au taux de 1/80, ce même sérum agglutinait très fortement (au taux de 1/640) la souche de *H. influenzae* type b (numérotée souche 58, Paris) reçue de Paris. De plus cette agglutination était d'un type très différent, à gros grumeaux indissociables.

On sait depuis les remarquables travaux de M. Pittmann [3] que *H. influenzae* peut se présenter sous deux phases : une phase dite spécifique de type et une phase non spécifique. En phase spécifique, les bactéries sont encapsulées et leur capsule renferme une substance spécifique soluble analogue au polyside capsulaire des pneumocoques. Les antisérums préparés avec les bactéries en phase spécifique précipitent la substance capsulaire soluble, permettant ainsi de classer les souches en six types étiquetés de a à f. De plus, ces sérums agglutinent fortement les souches du type homologue. En phase non spécifique au contraire, les bactéries ne sont pas capsulées et les souches ne peuvent plus être classées selon les mêmes types : il ne peut plus y avoir de précipitation de la substance soluble et la séro-agglutination n'est positive avec netteté qu'entre un sérum et la souche ayant servi à le préparer. La phase spécifique encapsulée se transforme rapidement en phase non spécifique non capsulée à la faveur d'une dissociation en deux types de colonies, dissociation inévitable et facile à observer.

Les colonies correspondant à la phase spécifique sont, en effet, fortement irisées lorsqu'on les observe en éclairage oblique ; en phase non spécifique, elles ont l'aspect transparent, bleuâtre, classiquement décrit.

(1) Nous tenons à remercier les personnes et les organismes qui nous ont permis de réunir les malades et tout particulièrement M. le Dr Roger Nataf, Chef de Service au Centre Ophtalmologique de Tunis, MM. les Drs Poirot et Arquembourg de la Mission O. M. S. en Tunisie, et les dispensaires Croix-Rouge de Tunisie.

(2) Grâce à l'obligeance de M. le professeur J. Dumas, que nous remercions bien vivement.

Nous pouvons donc essayer d'expliquer notre agglutination paradoxale de la façon suivante : la souche 11 Tunis était au départ une souche de *H. influenzae* en phase spécifique type *b*. Repiquée un grand nombre de fois sans précaution spéciale, elle a progressivement perdu ce caractère pour passer en phase non spécifique. Les lapins préparés peu de temps après l'isolement de cette souche ont reçu suffisamment de substance capsulaire pour élaborer des anticorps contre celle-ci. Mais au moment de l'épreuve de séro-agglutination, notre souche avait perdu pratiquement tout caractère spécifique et n'était plus agglutinée que faiblement par l'intermédiaire des antigènes contenus dans les corps microbiens eux-mêmes. Par contre, la souche 58 Paris (*H. influenzae* type *b*), qui venait d'être reçue de Paris sous forme lyophilisée et qui n'avait été repiquée qu'une fois, avait conservé intact son caractère spécifique. Il était donc normal qu'elle soit agglutinée fortement par le sérum anti-11 Tunis.

Cette hypothèse a été vérifiée par les réactions de précipitation mettant en évidence la substance soluble.

1° Nous avons préparé une solution de substance capsulaire de la souche 58 Paris (*H. influenzae* type *b*) en centrifugeant une suspension de cette souche en phase spécifique. Le surnageant donne une réaction de précipitation très nette avec le sérum anti-11 Tunis : en tube capillaire, il se forme un anneau opaque à la surface de contact. Le sérum anti-11 Tunis contient donc des anticorps précipitants et ne peut avoir été préparé qu'avec une souche de *H. influenzae* type *b*.

2° Reprenant la souche 11 Tunis dans l'état où elle se trouvait après de nombreux repiquages, alors qu'elle avait apparemment perdu tout caractère spécifique, nous l'avons ensemencée sur boîte de Petri de façon à obtenir des colonies séparées. En examinant attentivement ces boîtes en éclairage oblique, il nous a été possible de repérer de très rares colonies irisées. Repiquées, ces colonies irisées ont restitué la souche 11 Tunis dans son état initial de phase spécifique. Une solution de substance soluble préparée à partir de cette souche donne des réactions de précipitation très nettes avec le sérum anti-11 Tunis et avec le sérum anti-58 Paris obtenu entre temps. Par contre, une solution préparée de la même façon à partir d'une culture non irisée ne donne aucune réaction de précipitation.

La souche 11 Tunis est donc bien une souche de *H. influenzae* type *b*, que nous avons pu ramener à son état initial capsulé en phase spécifique.

Notre attention ayant été ainsi attirée sur la présence de *H. influenzae* dans les conjonctivites saisonnières en Tunisie, nous avons désormais recherché cette espèce microbienne dans tous les prélèvements que nous avons faits. Chaque culture sur boîte a été examinée en éclairage oblique pour repérer les colonies irisées de *H. influenzae* en phase spécifique. Cela implique obligatoirement l'emploi d'un milieu de culture transparent, par exemple une gélose à l'extrait globulaire, à l'exclusion des milieux opaques comme la gélose au sang cuit, dite gélose chocolat. Nous avons pu ainsi isoler deux autres souches qui appartiennent cette fois au type *a*.

Au cours de la même campagne estivale, nous n'avons donc obtenu que 3 souches de *H. influenzae* authentique à côté de plus de

100 souches de ce que nous continuons à appeler bacille de Koch-Weeks. Mais ce petit nombre est certainement inférieur à la réalité car certaines souches peuvent avoir perdu leur caractère spécifique dès le premier repiquage. A plusieurs reprises, des colonies parfaitement irisées sur la boîte d'isolement ont donné des subcultures non irisées et ne contenant plus de polyoside identifiable.

Il existe donc, à peu près certainement, des *H. influenzae* en phase non spécifique parmi les hémophiles isolés des conjonctivites saisonnières. Les travaux ultérieurs préciseront éventuellement si les souches restantes peuvent être rassemblées en un groupe homogène qui constituerait le véritable bacille de Koch-Weeks.

RÉSUMÉ. — 1° Trois souches de *H. influenzae*, appartenant aux types *a* et *b*, ont été isolées de cas de conjonctivite saisonnière en Tunisie.

2° Cela implique la possibilité de l'existence de nombreuses souches de *H. influenzae* en phase non spécifique parmi les hémophiles que nous appelons bacille de Weeks.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. KOCH. *Wien. med. Wschr.*, 1883, **33**, 1548.
- [2] J. E. WEEKS. *Arch. Ophthalm.*, 1886, **15**, 441.
- [3] M. PITTMAN. *J. exp. Med.*, 1931, **53**, 471

L'ÉDIFICATION FIBRINEUSE. LA BARRIÈRE EXPÉRIMENTALE CONTRE LA TOXI-INFECTION

par L. DUCHON.

(Laboratoire de Secteur de l'Hôpital Trousseau.)

Dans un exposé précédent [1], nous avons montré entre plaquettes et hémocoques certaines relations physiologiques qui coordonnent leurs rôles dans l'édification du réseau fibrineux. Mais cette particularité n'est que l'élément primordial disséqué d'un complexe que nous voulons maintenant préciser.

Tout d'abord, en dehors des organismes apparents du sérum (plaquettes, hémocoques), nous avons été amené à considérer celui-ci sous l'aspect d'un film visqueux, véritable support des éléments précités et dissociable de son excipient. En effet :

Technique. — Taillons dans un tissu uni, très mince, en matière plastique, deux bandes rectangulaires de 50 mm × 10 mm. Juxtaposées, découpons sur un bord des échancrures en dents de scie. Passons-les dans la paraffine fondue vers 100°. Après égouttage soigné

sur les bords de la coupelle, laissons refroidir. Nous conseillons alors de les disposer sur une lame flambée refroidie, les dents de scie placées vis-à-vis, mais sans contact. Une autre lame est passée sur la flamme et chaude est appliquée sur la précédente. La paraffine à peine fondue, on reprend cette lame avec les deux bandes collées sur elle. On la porte sur une platine chauffante. On recouvre d'une lamelle à la dimension. Puis pour régulariser toutes les préparations au mieux, on la retire et, encore chaude, on fait effectuer la prise du tout sous la pression d'un poids de 2 kg. Ainsi on a réalisé entre lame et lamelle une succession de chambres en losanges étanches, mais communiquant entre elles, et avec l'extérieur aux extrémités.

Avec une pipette bien effilée prélevons du sérum décanté d'un sang humain (non en état d'intoxication), citraté à 0,25 cm³ de solution de citrate à 10 p. 100 pour 8 à 10 cm³ de sang dans les deux ou trois heures qui suivent sa prise. Par l'une des entrées, laissons écouler doucement le sérum qui remplit les chambres. Puis lutons partout. (Il est bon d'expérimenter plusieurs sangs.)

Portons les préparations à la température de 20° à 22°. Observons toutes les demi-heures.

Avec une certaine fréquence, on constate, plus ou moins tôt dans les heures qui suivent, qu'une modification apparaît. C'est un aspect moiré de la masse avec tendance au groupement des plaquettes jusque-là isolées et mobiles. Groupement qui va se préciser en de magnifiques agglutinats, soit en houppes circulaires bien connues mais peut-être pas avec cette magnificence, soit en festons plus ou moins allongés. Les plaquettes ainsi groupées s'immobilisent, perdent leurs mouvements browniens. Dans une bonne préparation, houppes et festons sont nombreux, et après de multiples observations on constatera que ces formations apparaissent surtout dans les zones tourbillonnaires. La turbulence de la masse liquidienne, provoquée par le dispositif en chicane des dents de scie, a ainsi aidé à leur édification. L'épaisseur de la chambre n'est pas sans avoir aussi son influence. On observe de plus que l'aspect moiré fait place à une condensation en nappes espacées, plus ou moins étendues : une sorte de film est apparu. Bientôt ce film se sous-tend d'un canevas de rayures et le système semble amarrer entre eux et à distance festons et houppes. Surtout au niveau du feston on remarquera que le substratum de cette formation est constitué par le film sur lequel, telle une nappe colloïde, sont immobilisées les plaquettes. Le phénomène est d'une fort belle apparence souvent vers la cinquième heure. Il n'est pas stable, du moins à cette température. Après un temps variable, il va s'effaçant. Quelque vingt-quatre heures après, il n'est pas rare de le voir à peu près disparu, *les plaquettes ayant repris leur danse brownienne*.

Quant à la houppe, en pomme de pin d'abord, on observe, après un temps variable, quand la préparation s'y prête, qu'elle prend un aspect floral : au centre, un disque d'aspect hyalin, reste du film fixateur (ou métamorphose visqueuse des plaquettes) et autour une corolle de plaquettes paraissant retenues au bord du disque par une force centripète qui se matérialise en aspect filamenteux.

Ces agglutinats de plaquettes sont donc de pseudo-agglutinats

physiologiques qui s'opposent, comme nous le verrons, aux agglutinats stables, vrais, d'une toute autre origine.

Le système est soumis aux influences thermiques : moins facile à obtenir à mesure que l'on s'élève au-dessus de 20°, bien moins précis à 37°, ce dispositif trouve vers 0° plus d'aisance et une plus grande stabilité.

Deux éléments nous semblent coordonner ce phénomène : à la turbulence s'ajoute la qualité du milieu sérique, d'un rôle capital, dont sans doute sa qualité de viscosité. Nous retrouvons, en effet, ici les propriétés des corps visqueux :

a) l'influence, en raison inverse de la température sur le degré de viscosité, qui semble d'autre part expliquer cette sorte de gélification du fibrinogène en un film instable dissout de son excipient, fibrinogène parce que dès maintenant dans certains sangs, citratés au minimum, on peut voir apparaître des filaments de fibrine se constituant dans le film tendu d'une houppe à l'autre, qui, eux indélébiles, fixent définitivement le dispositif. Observation qui deviendra constante par la suite sous l'influence de la coagulase d'un micro-organisme ;

b) l'influence du mouvement sur les couches moléculaires de ces liquides visqueux qui se déplacent, non sans frottement, en rassemblant dans leurs remous les corps étrangers qu'ils supportent.

L'observation de ce phénomène de la « turbulence visqueuse » va maintenant nous permettre d'observer *in vitro* l'édification fibrineuse de défense contre l'infection constituant le « clou de la défense » par analogie avec le clou hémostatique et dont les imperfections du système pourront être utilisées comme tests de perturbations sériques.

Technique. — Comme ci-dessus, préparons des bandes, mais découpées en trapèzes. Côtés parallèles : l'un 5 cm, l'autre 5 mm. Côtés obliques : l'un sera plus grand, hauteur 10 mm. En opposant les deux petits côtés à environ 1 mm, incluons-les comme ci-dessus entre lame et lamelle. Nous aurons ainsi constitué, pratiquement stérilement, deux chambres triangulaires, inégales, opposées par le sommet, mais réunies par un isthme étroit.

Prélevons de même le sérum d'un sang sain, citraté au même taux. La pipette très effilée permettra au sérum de s'écouler lentement jusqu'à remplir régulièrement la grande chambre, puis l'isthme, et jusqu'à déborder légèrement dans la petite chambre.

D'autre part, à X gouttes de ce même sérum fortement centrifugé, ajoutons une gouttelette d'une suspension en eau distillée, d'un *Staphylococcus aureus* à coagulase active prélevé sur une gélose de vingt-quatre heures. La suspension sera très peu chargée. Il convient que la progression du phénomène soit lente. On portera ce sérum dans la petite chambre qu'il remplira en ayant soin qu'il prenne contact avec l'autre. On luera soigneusement et même à deux reprises. Portons de préférence à 20° bien qu'à 37° le résultat soit le même. Observons dans les heures et jours qui suivent.

Bien entendu les figures de turbulence visqueuse apparaîtront avec prédilection dans la zone isthmique.

Voici par ailleurs ce que donne petit à petit la superposition des observations non synchrones.

Dans la petite chambre, le staphylocoque libère lentement sa toxine

coagulante. Rapidement, à ce contact, les plaquettes s'altèrent, s'amenuisent, les cellules se figent. Puis la fibrine apparaît et se tend en ce dispositif étoilé déjà écrit [1].

Au niveau de l'isthme, où les plaquettes sont de plus en plus abondantes, il est de plus en plus fourni. Et, à hauteur des houppes, l'édifice se renforce d'une véritable barrière tendue d'un bord à l'autre de l'isthme. Elle se constitue peu à peu en un réseau de fibrine dont les filaments empruntent ceux du film et sont tendus entre cellules, houppes, festons. Ces formations, indélébiles cette fois, deviennent avec la cellule qui subit un étalement métamorphique les bouées d'amarrage du réseau. Il faut suivre pas à pas si l'on veut comprendre la structure de l'ensemble.

En progressant vers la grande chambre, on observe que ces bouées d'abord petites, amenuisées, comme les plaquettes constitutives ou voisines sous l'influence de la toxine sont réunies par des filaments fins. Plus loin, et cela est visible petit à petit, le lendemain, les nœuds du réseau deviennent de plus en plus volumineux. Ils sont de superbes « pains à cacheter » d'un éclat d'or signant parfois encore leur origine par une corolle de plaquettes. Entre eux sont tendus des écheveaux de câbles plus ou moins épais délimitant des mailles plus ou moins serrées. Tous caractères dont le degré fait la qualité du système. La barrière constituée, et tendue par des filaments fixés sur les bords de l'isthme, est dans son ensemble et son détail d'un spectacle admirable au contraste de phase.

Dans ce détail, nous remarquerons tout d'abord le rôle actif joué par les plaquettes : c'est leur raréfaction au fur et à mesure de la précipitation fibrineuse, c'est même leur disparition totale là où la barrière est le mieux édifiée. Conjointement, bien entendu, disparition des hémocoques. La barrière peut avancer plus ou moins loin dans la grande chambre, mais souvent elle se limite brusquement. Dans cette région, zone de croissance, on observera certaines particularités de son édification. Nous remarquerons la tendance des plaquettes encore libres au groupement autour des nœuds en formation ou le long des fils tendus et en proportion inverse de leur raréfaction dans l'intérieur des mailles. Cette tendance, si elle a pu trouver un point de départ dans la formation des houppes ou festons, en dehors de tout courant liquidien à une autre origine. Une longue observation nous a montré la participation des cellules polynucléées. Ce rôle est bien observable sur un sang riche en cellules (suppurant récent non antibiotisé). Il se révèle par l'apparition de l'intense activité des mouvements amœboïdes (sous l'influence toxique) qui les mobilisent sans arrêt, les faisant s'insinuer entre les fils, les nœuds paraissant être un pôle d'attraction. Dans ces déplacements, certaines entraînent sur de plus ou moins grandes distances des plaquettes accumulées, à l'opposé de leur pôle actif de déformation, en grappes et sans mouvements browniens (parfois, chemin faisant, elles sont larguées comme engluées entre elles). Les cellules ainsi chargées finalement ont tendance à s'échouer sur les nœuds d'où l'accumulation des plaquettes. De plus, là tout semble subir une transformation lytique de renfort. Ce qui explique la disparition quasi-totale de ces deux éléments à l'intérieur des mailles, pour le type de sang utilisé.

Nous retrouvons donc ici le même dispositif, mais de formation plus lente, que nous avons observé dans la phagocytose provoquée par l'agitation [2].

Ainsi tendue en travers, la barrière se termine brusquement, reliée seulement à quelques bouées nodales avancées en édification. Au delà souvent une zone moins riche en plaquettes, puis celles-ci à l'abri de la toxine réapparaissent denses ayant recouvert leur aspect normal et leurs mouvements browniens. Parfois pourtant, surtout près de la barrière, elles ont tendance à prendre un aspect filamenteux. Quant aux figures de turbulence, souvent fort belles du début, elles se sont effacées ; il ne subsiste que quelques houppes squelettiques. La préparation se trouve donc divisée en deux zones par une barrière. Edifice qui en a non seulement l'aspect, mais la fonction.

L'infection reste bridée, fixée, limitée au petit triangle. *Quel que soit le temps d'observation, l'édifice reste intact.* Fait curieux, le coccus, méconnaissable dans sa gangue fibrineuse, végète car il est cultivable, mais ne prolifère pas (nous parlons toujours de sérums sains).

L'étanchéité du système et plus particulièrement de la barrière, révélée déjà par l'arrêt de la diffusion de la toxine qui permet au delà aux plaquettes de retrouver leur intégrité, peut être encore mise en évidence de la façon suivante : après avoir très délicatement fait sauter la paraffine qui ferme le petit triangle et sans altérer la barrière, on insinue une trace de colorant. Lutée à nouveau et placée verticalement, une barrière intacte arrêtera la descente du colorant.

Le staphylocoque est le micro-organisme de choix pour cette étude. Si on utilise un streptocoque hémolytique fibrinolytique, différentes modifications peuvent apparaître : importantes altérations plaquettaires, houppes altérés, turbulence qui a tendance à disparaître, tout ceci impliquant une modification plus ou moins profonde de l'architecture fibrineuse.

Si l'on peut observer le dispositif du réseau, ou celui du barrage parfois reporté au fond du grand triangle ou parfois tendu comme un filet au-devant de l'envahissement d'amas de chaînettes libres, on peut plus fréquemment et plus ou moins tôt observer, taillées à l'emporte-pièce en plein réseau, des zones de lyse concentrique à la colonie croissante.

Bien entendu, toxicité du pathogène et qualité du sérum coordonnent leurs effets et la résultante peut aller jusqu'à la dislocation totale du système.

Au système de la défense par la phagocytose de Metchnikoff, activée dans certaines conditions de provocation [2], l'organisme semble donc associer un système complémentaire de nature passive où les plaquettes et hémocoques jouent un rôle de premier plan, d'où l'intérêt du nombre des globulins dans ce système [3].

En résumé, l'organisme semble pouvoir tendre une barrière au-devant de l'envahissement microbien et de la diffusion de ses toxines. La constitution de cette barrière est un réseau fibrineux qui a pour point de départ la précipitation d'un film visible. Ce réseau à mailles géo-

métriques s'amarre à des points nodaux nés de l'agglomération des plaquettes groupées sous l'influence de la viscosité de ce film et de ses mouvements et renforcées par l'apport cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. DUCHON. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 458 et 461.
- [2] L. DUCHON. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 221.
- [3] L. DUCHON. *Bull. et Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, 19 juillet 1940.

ACTION DU PARA-AMINO-SALICYLATE D'ISONICOTYL HYDRAZIDE SUR LES MYCOBACTÉRIES

I. — ACTION BACTÉRIOSTATIQUE EXERCÉE *IN VITRO*

par J. VIALLIER et R.-M. CAYRÉ.

(Institut Pasteur, Lyon)

Le pasiniazide ou P. I. (1) que nous avons utilisé provient de la combinaison d'acide para-amino-salicylique et d'isoniazide. Son action *in vitro* sur la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* a été mise en évidence par R. Kourilsky, S. Kourilsky et S. Micoulaud [4].

Nous avons étudié l'activité bactériostatique exercée sur des souches de Mycobactéries, pathogènes ou non, sensibles ou non à l'isoniazide. La technique suivie a été exposée par ailleurs [2]. Elle utilise le milieu de Youmans, sérum de cheval liquide et l'antibiotique en solution aqueuse. Les souches choisies sont ensemencées avec les précautions habituelles, dans des milieux contenant ou non l'antibiotique, et les lectures faites après quinze, trente, quarante-cinq, soixante jours de séjour à l'étuve à 37°, en ne tenant compte que des résultats macroscopiques. Nous avons utilisé isoniazide et P. I. à des concentrations équivalentes et indiqué l'activité du P. I. d'après sa teneur théorique en isoniazide (2).

La sensibilité de 8 souches de bacilles tuberculeux virulents récemment isolés de lésions tuberculeuses, sensibles à l'isoniazide au moins à 0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, a été recherchée comparativement au pasiniazide et à l'isoniazide à des concentrations comprises entre 0,003 et 0,1 μg , au PAS entre 0,0043 et 0,14 et à l'association isoniazide-PAS dans des proportions correspondant aux doses théoriques. Bien que l'écart très faible des concentrations dans deux tubes successifs n'ait pas permis de retenir des divergences d'action de l'ordre d'un seul tube, l'activité

(1) Le produit (pasiniazide) nous a aimablement été fourni par le Laboratoire de l'Hépatrol, que nous remercions.

(2) 100 mg de P. I. correspondent à 49 mg d'INH et 70,3 mg de PAS sodique cristallisé.

bactériostatique du P. I. au quinzième jour s'est manifestée pour des zones de concentrations équivalentes à celle de l'isoniazide. L'association isoniazide-PAS nous a donné des résultats superposables. Le tableau I résume les résultats obtenus.

TABLEAU I.

Sensibilité comparée au pasiniazide, à l'isoniazide, au PAS, et à l'association PAS-isoniazide de souches de *Mycobacterium tuberculosis*, var. *hominis*, sensibles à l'isoniazide et au PAS.

Souches		Pasiniazide en g					Isoniazide en g					PAS en g					Association Isoniazide PAS				
		0,003	0,006	0,01	0,02	0,05	0,003	0,006	0,01	0,02	0,05	0,003	0,006	0,01	0,02	0,05	0,003	0,006	0,01	0,02	0,05
CHA...	15 j	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15.5.55																					
Co...	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
13.6.55																					
Ca...	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
7.6.55																					
La...	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
18.6.55																					
BO	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14.6.55																					
DU...	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
9.6.55																					
Bi...	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2.6.55																					
Lo	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.6.55																					

Lecture effectuée au quinzième jour : + tubes ayant poussé ; — absence de culture ; i illisible, ininterprétable.

Une expérimentation plus longue a porté sur des souches isoniazido-résistantes. Une première série de 16 souches insensibles à 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ d'isoniazide mais sensibles au moins à 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de PAS (sel sodique), a été enssemencée comparativement, dans des milieux contenant INH ou P. I. Au quinzième jour, 15 d'entre elles s'étaient développées malgré une concentration d'INH égale ou supérieure à 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ et au quarante-cinquième jour, ces 15 souches avaient poussé dans le dernier tube qui contenait initialement 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ du produit. Par contre, au quinzième jour, 15 souches avaient une sensibilité au P. I. comprise entre 0,5 et 2,5 μg et, au soixantième jour, 5 seulement n'avaient eu toute croissance inhibée que par la concentration de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ alors que les 10 autres étaient restées sensibles à 2,5 μg . La 16^e souche, ne comportant que de rares éléments iso-résistants (1/10), était insensible au

soixante-cinquième jour à 20 μg d'INH et était sensible à 0,5 de P. I.

Trois souches iso-résistantes à plus de 10 μg et à 20 μg de PAS étaient restées sensibles au soixantième jour à 5 ou 2,5 μg de P. I.

L'activité bactériostatique indéniable exercée par le P. I. sur ces souches iso-résistantes, à des concentrations théoriques inférieures à celle de l'isoniazide pour être active, nous a incités à une seconde série de recherches. Quinze souches, récemment isolées de lésions humaines, ont été testées comparativement au P. I., à l'INH et au PAS. Les quantités utilisées correspondaient aux doses théoriques de P. I. en isoniazide et en PAS. Une souche iso-sensible et sensible au PAS, témoin, avait une sensibilité équivalente au quarante-cinquième jour pour les trois antibiotiques (+ 0,1 — 1). La croissance de 9 souches iso-résistantes (au moins 10 μg) et sensibles au PAS (au plus 1,5 μg au soixantième jour) avait été inhibée par des concentrations de P. I., exprimées en INH, beaucoup moins élevées que celles nécessitées par l'INH seul, si bien que la comparaison des derniers tubes poussés donnait les concentrations suivantes pour le P. I. et l'INH :

+ 0,05 + 30 — + 0,5 + 20 — + 2,5 + 10 — + 5 + 20 — + 2,5 + 30 — + 0,5 + 10 — + 0,5 + 30 — + 0,5 + 30. Pour 6 souches iso-résistantes au soixantième jour au moins à 10 μg d'INH et à 7,5 μg de PAS, quatre fois le P. I. se montra plus actif et sur 2 souches l'activité fut équivalente. Pour une seizième souche, enfin, insensible à 15 μg de PAS, l'activité du P. I. se montra inférieure (+ 2,5) à celle de l'INH (+ 1).

3 souches de *Mycobacterium tuberculosis*, var. *avium*, 4 souches de Mycobactéries non pathogènes et 12 souches homogènes provenant de la collection P. Courmont, testées comparativement aux trois antibiotiques, se sont montrées insensibles à des concentrations équivalentes (30 μg d'INH — 45 μg de PAS) et dans la zone de concentration utilisée, le produit n'a manifesté pour ces souches aucune activité bactériostatique.

Ces résultats nous ont fait admettre l'existence habituelle d'une activité bactériostatique, indéniable mais relative, du P. I. sur les souches iso-résistantes, l'activité du produit se manifestant à des concentrations pouvant être atteintes *in vivo*, alors qu'aux mêmes concentrations, l'isoniazide reste inefficace.

Afin d'étudier le mécanisme d'action du produit et de vérifier si cette efficacité avait été attribuée ou non à l'activité du PAS, nous avons étudié comparativement, comme nous l'avons fait pour les bacilles sensibles, l'action bactériostatique exercée par le pasiniacide, l'isoniazide, le PAS et l'association PAS-isoniazide sur 33 souches iso-résistantes.

25 étaient sensibles au PAS, vingt-quatre fois le P. I. se montra actif et, d'une façon pratiquement superposable à l'association PAS-INH, une seule souche, bien que sensible au PAS, se montra insensible au P. I. comme à l'association. Une nouvelle souche isolée ultérieurement du même sujet, PAS résistante, entre dans la rubrique suivante et nous n'avons pas pu éliminer de façon formelle que la malade, au cours de tribulations hospitalières multiples, n'ait pas reçu de pasiniacide.

3 souches étaient résistantes au PAS. Pour 2, le P. I. se montra,

comme l'INH et le PAS, dénué de toute activité, pour l'autre, il se montra relativement actif, l'association ayant une activité à peu près superposable.

5 souches avaient une sensibilité au PAS diminuée. Quatre fois l'action bactériostatique du P. I. correspondait à l'association et aux chiffres théoriques de la sensibilité au PAS. Une fois elle était légèrement supérieure.

Ces résultats nous ont fait admettre que, dans l'ensemble des cas, le pasiniacide exerçait une activité bactériostatique sur les souches iso-résistantes et sensibles au PAS dans une zone où l'INH reste inactif *in vitro*.

Sur les souches résistantes à la fois au PAS et à l'INH, l'action s'est également manifestée, mais d'une façon inconstante, variable selon les souches, à des concentrations théoriques qui peuvent être obtenues *in vivo*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. KOURILSKY, S. KOURILSKY et S. MICOULAUD. *Thérapie*, 1954, 9, 273.
[2] J. VIALIER et R. M. CAYRÉ. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, 147, 1789.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Evaluation du pouvoir antitoxique des sérums anti-*perfringens* A. Historique, par M^{lles} M. GUILLAUMIE, A. KREGUER et M^{me} M. GEOFFROY.

Recherches sur la mesure de l'activité hémicellulolytique des sols. I. Exposé des faits, par J. AUGIER.

Etude radiobiologique du système lysogène d'*Escherichia coli* K12. I. Rayons X. II. Induction par les rayons X et γ . Etude des faibles doses, par H. MARCOVICH.

La maladie hémolytique expérimentale du mouton. Transmission par voie placentaire, par O. GIRARD, L. PODLIACHOUK, A. EYQUEM et P. MILLOT.

Précipitation *in vitro* du collagène A par une endotoxine bactérienne. Note préliminaire, par A. DELAUNAY, S. BAZIN et M. HÉNON.

Croissance et morphologie d'*Histoplasma capsulatum*. Etude comparative de 18 souches américaines et africaines, par E. DROUHET et J. SCHWARZ.

AVIS

Le VI^e Congrès International de la Science du Sol aura lieu à Paris en août-septembre 1956. Il comprendra une Section de Biologie du Sol comprenant 6 sous-sections (Microbiologie, Technologie, Biochimie, Algologie, Mycologie et Zoologie du Sol).

Pour l'organisation générale du Congrès, s'adresser au Secrétariat général : 3, rue de Penthhièvre, Paris (8^e).

Pour la Section de Biologie, au D^r Prévot, chef de service à l'Institut Pasteur, 25, rue du D^r-Roux, Paris (15^e).

LIVRES REÇUS

M. C. Pangborn, J. O. Almeida, F. Maltaner, A. M. Silverstein et W. R. Thompson. — *Cardiolipin antigens*. Monographie de l'O. M. S. n° 6, 1954. 1 vol., 52 p. Prix : Frs. s. 4, 6/9, \$ 1,25. (Dépositaires pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris-6^e.)

Il s'agit de la seconde édition de cette monographie, dont la première avait paru en 1951, et qui a été établie en tenant compte des différents progrès réalisés au cours de ces trois années. L'ouvrage décrit en détail les techniques de préparation de ces antigènes (extraction, purification, conditions de conservation, etc.), leur composition chimique, et enfin les réactions sérologiques (déviations du complément) qu'ils permettent, de nombreux tableaux indiquant les différents temps de la méthode. Une courte bibliographie termine le volume.

H. T.

E. J. Pampana et P. F. Russell. — *Le paludisme, problème mondial*. Monographie de l'O. M. S., 1955. 1 vol. 78 p., 25 fig. Prix : Fr. s. 2, 3/6, \$ 0,70. (Dépositaires pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris-6^e.)

Les auteurs exposent tout d'abord la nature et l'étendue du paludisme ; ils en font un bref historique, étudient sa fréquence et sa répartition dans le monde et en indiquent les conséquences d'ordre social et économique ; puis ils décrivent les méthodes de lutte, anciennes et nouvelles, et en évaluent l'efficacité ; enfin ils discutent la notion d'« éradication du paludisme ». Ils attirent l'attention sur les mesures de caractère national et international qui ont été prises, ces dernières années, pour combattre la maladie et sur les progrès impressionnants de la lutte antipaludique depuis la deuxième guerre mondiale. Le dernier chapitre traite des possibilités futures. Il étudie le coût des campagnes, la résistance aux insecticides, les obstacles

d'ordre social qui s'opposent à une action mondiale dirigée contre le paludisme, et les conséquences qu'entraînerait son éradication.

H. T.

Statistiques épidémiologiques et démographiques annuelles, 1952. O. M. S., 1 vol., 543 p., 1955. Prix : Fr. s. 30, Fr. fr. 2 400, sh. 10, \$ 7,50. Edition bilingue (français et anglais). [Dépositaires pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris-6^e].

Ce volume de plus de 540 pages, réparties en 73 tableaux statistiques, offre un aperçu général et varié de l'état démographique et sanitaire des divers pays du monde en 1952, notamment en ce qui concerne la fréquence des maladies infectieuses et l'importance des diverses causes de décès. Certains sujets sont exposés d'une manière particulièrement détaillée. C'est ainsi que l'ouvrage permet de se faire une idée de l'importance des diverses localisations du cancer et de la tuberculose, d'après le sexe, aux différents âges de la vie, et de mesurer la gravité de certaines affections qui frappent particulièrement les jeunes enfants. Il contient, pour la première fois, un tableau détaillé montrant la proportion des décès pour chaque sexe et à différents âges, qui n'ont pu faire l'objet d'un diagnostic médical. Le sociologue, le démographe, l'hygiéniste puiseront une foule d'enseignements dans les tableaux de ce volume.

H. T.

Alcool et alcoolisme. Rapport d'un Comité d'Experts. O. M. S., Série de Rapports techniques, n° 94, 1955. Prix : Fr. s. 1, 1/9, \$ 0,30. (Dépositaires pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris-6^e.)

Législation relative à l'assistance psychiatrique ; quatrième rapport du Comité d'Experts de la Santé mentale. O. M. S., Série de Rapports techniques, 1955, n° 98. Prix : Fr. s. 1, 1/9, \$ 0,30. (Dépositaires pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris-6^e.)

J. Duclaux. — *Centrifuges et ultracentrifuges.* 1 vol., 126 p., 46 fig. Hermann et C^o, édit., Paris, 1955. Prix : 800 fr.

Dans le cadre de son *Traité de Chimie-Physique appliquée à la Biologie*, J. Duclaux publie en une centaine de pages ce qu'il est indispensable de connaître sur l'ultracentrifugation. Réservée pendant longtemps à un petit nombre de chercheurs, des perfectionnements successifs (que l'auteur passe rapidement en revue) ont fait entrer cette technique dans la pratique courante des laboratoires de recherches. Les applications diverses de l'ultracentrifugation sont décrites sommairement : détermination de la taille des virus, étude sur les enzymes, les toxines, les anticorps. Pour beaucoup de biochimistes, l'ultracentrifugation apparaît comme le moyen le plus sûr de déterminer les masses moléculaires des grosses molécules. L'auteur montre les

résultats différents obtenus par divers chercheurs et qui s'expliquent par les difficultés de la théorie. On a considéré pendant longtemps les poids moléculaires des protéines comme des multiples de 32 500 ; cette loi est maintenant considérée comme tout à fait douteuse. Dans beaucoup de cas, l'ultracentrifugation n'est pas plus précise que les autres méthodes. Employée seule, ses possibilités sont limitées ; elle reste cependant une technique irremplaçable dans l'étude de la polydispersion des préparations colloïdales. Complété par une abondante bibliographie, ce petit livre apportera à tous les physicochimistes et biochimistes de très précieux renseignements.

P. S.

F. H. Schulz. — *Das Fibrinogen*. 1 vol., 143 p., 90 fig., 81 tabl. Georg Thieme, édit., Leipzig, 1954. Prix : DM. 17,60.

L'auteur a réuni dans ce volume l'ensemble des résultats concernant les modifications du taux de fibrinogène au cours des processus normaux et pathologiques.

Après avoir fait l'exposé des différentes méthodes de dosage par gravimétrie, réfractométrie et méthode de micro-Kjeldahl, il estime que celle-ci est la plus sûre. L'étude chimique n'a pas révélé de différence entre le fibrinogène et la fibrine. Les concentrations de fibrinogène ont été étudiées dans le sang veineux, artériel, et la lymphe, au cours de différents états physiologiques. Le taux en est constant chez l'individu normal à jeun. L'influence des différentes affections sur la concentration de fibrinogène a été analysée systématiquement, notamment au cours des maladies du sang et du système réticulo-endothélial, surtout leucémie aiguë et lymphogranulomatose (maladie de Hodgkin) ; maladies cardio-vasculaires, pulmonaires ; importance de la fibrinolyse au cours du cancer des bronches ; affections hépatiques ; polyarthrite chronique.

L'étude des propriétés biologiques a été pratiquée au microscope à contraste de phase. Le fibrinogène est formé en majeure partie par le foie, mais on ignore encore le rôle de la moelle osseuse et du système réticulo-endothélial.

L'importance des renseignements contenus dans cet ouvrage en fait un instrument d'une valeur certaine pour tous ceux qui s'intéressent à la pathologie générale.

A. E.

Le Gérant : G. Masson.